

# 重组I型人源化胶原蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达及纯化

滕飞<sup>1</sup>, 柯博文<sup>1</sup>, 全冰华<sup>2</sup>, 王勇<sup>3</sup>, 易祥<sup>2,3</sup>, 韩双艳<sup>1\*</sup>

(1. 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)  
(2. 广西福莱明生物制药有限公司研发中心, 广西南宁 530000) (3. 中华生物医药研究院, 中国香港 999077)

**摘要:** 胶原蛋白 (Collagen) 目前广泛应用于食品、医疗、美容等领域, 然而, 重组胶原蛋白存在包涵体形式表达及纯度较低等问题, 限制了其规模化生产及制备应用。该研究在 I 型人源化胶原蛋白 hCOL1A1 的基础上, 在其 N 末端融合了小分子泛素样修饰蛋白 (SUMO) 和 6×His 标签, 构建了重组表达载体 pET21a (+)-SUMO-hCOL1A1, 并转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)。通过对工程菌 BL21 (DE3) /pET21a (+)-SUMO-hCOL1A1 进行 IPTG 诱导表达、培养条件的优化及蛋白的分离纯化, 实现了重组 I 型人源化胶原蛋白 hCOL1A1 在大肠杆菌中的可溶性表达及有效纯化。工程菌破碎上清经 Ni-NTA 亲和层析、TEV 酶切、离子交换层析纯化, 可收获纯度 95% 以上的 hCOL1A1 蛋白。所确定的 25 °C 诱导培养温度, 添加 0.4 mmol/L IPTG 的最佳诱导培养条件, 进一步在 5 L 发酵罐进行分批补料发酵放大, 最终蛋白产量达到 1.43 g/L。该研究实现了 hCOL1A1 蛋白的可溶表达、5 L 发酵罐生产及纯化, 为重组胶原蛋白大规模生物合成及纯化提供了参考。

**关键词:** I 型胶原蛋白; 重组人源化胶原蛋白; 融合表达; 蛋白纯化; 分批补料发酵

文章编号: 1673-9078(2024)12-41-48

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1449

## Soluble Expression and Purification of Recombinant Humanized Type I Collagen in *Escherichia coli*

TENG Fei<sup>1</sup>, KE Bowen<sup>1</sup>, QUAN Binghua<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>3</sup>, YI Xiang<sup>2,3</sup>, HAN Shuangyan<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)(2. Guangxi Fu Lai Ming Biopharmaceuticals Co. Ltd., Nanning 530000, China)(3. China Academy of Bio Medicine, Hongkong 999077, China)

**Abstract:** Collagen is currently widely used in the food, medical, and beauty industries. However, isolating recombinant collagens poses considerable challenges because of factors such as inclusion body expression and low purity, limiting its large-scale production and application. Based on humanized type I collagen (hCOL1A1), a recombinant expression vector pET21a(+)-SUMO-hCOL1A1 was constructed by fusing a small ubiquitin-like modifier protein (SUMO)

引文格式:

滕飞, 柯博文, 全冰华, 等. 重组 I 型人源化胶原蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达及纯化[J]. 现代食品科技, 2024, 40(12):41-48.

TENG Fei, KE Bowen, QUAN Binghua, et al. Soluble expression and purification of recombinant humanized type I collagen in *Escherichia coli* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 41-48.

收稿日期: 2023-12-05

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2102700)

作者简介: 滕飞 (1998-), 男, 硕士, 研究方向: 蛋白表达及纯化, E-mail: 202121050043@mail.scut.edu.cn

通讯作者: 韩双艳 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物酶学, E-mail: syhan@scut.edu.cn

and 6×His tag at the N-terminus of hCOL1A1, which was then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). Soluble expression and purification of recombinant hCOL1A1 in *E. coli* were achieved through IPTG induction, optimization of the culture conditions, and protein purification of the engineered strain produced by BL21/pET21a(+)-SUMO-hCOL1A1. The supernatant of the engineered strain was purified through Ni-NTA affinity chromatography, TEV enzyme digestion, and ion-exchange chromatography, ultimately yielding hCOL1A1 protein with a purity of over 95%. The optimal culture conditions were determined to be an induction temperature of 25 °C and a concentration of 0.4 mmol/L IPTG. Further scale-up in 5 L fed-batch fermentation resulted in a final protein yield of 1.43 g/L. Soluble expression of the hCOL1A1 protein, 5 L bioreactor production, and purification were achieved, serving as a valuable reference for the large-scale biosynthesis and purification of recombinant collagen.

**Key words:** type I collagen; recombinant humanized collagen; fusion expression; protein purification; fed-batch fermentation

胶原蛋白是一类功能性蛋白, 约占人体总蛋白的三分之一<sup>[1]</sup>。天然胶原蛋白包含有多个 $\alpha$ -螺旋链, 每个 $\alpha$ -螺旋都包含大量(Gly-x-y)<sub>n</sub>重复序列, x、y通常代表脯氨酸、羟脯氨酸或羟赖氨酸<sup>[2]</sup>, 这种特殊结构赋予了它稳定性、良好的生物相容性和可降解性<sup>[3]</sup>。其在化妆品制剂<sup>[4]</sup>、皮肤组织修复<sup>[5]</sup>、生物复合材料<sup>[6]</sup>等领域均有广泛的应用前景和商业价值, 《国内高品质胶原蛋白行业发展白皮书》预计, 全球胶原蛋白市场规模到2027年将达226.22亿美元, 其中中国胶原蛋白的市场规模预计将达15.76亿美元, 约占全球市场的6.96%<sup>[7]</sup>。此外, 国家食品药品监管总局数据显示, 胶原蛋白相关的保健食品已发展至190余种, 包括胶囊、冲剂等<sup>[8]</sup>, 用于肉制品和乳制品当中的例子也不胜枚举, 研究表明胶原蛋白可以用于改善食品口感及质量<sup>[9]</sup>。目前, 天然胶原蛋白主要利用传统酸碱法进行分离提纯, 面临纯度较低, 具有病毒隐患等问题<sup>[10,11]</sup>, 限制了胶原蛋白的应用开发, 因此, 重组胶原蛋白具有广阔的发展前景。其中, 大肠杆菌相较其他宿主生长速度快、培养成本低、遗传背景清晰<sup>[12]</sup>, 通过基因改造、高密度培养、下游分离纯化, 能大大降低重组胶原蛋白的生产成本<sup>[13]</sup>, 提升其在食品、化妆品、生物材料领域的潜力<sup>[14]</sup>。

目前已报道约29类胶原蛋白<sup>[15]</sup>, I型胶原蛋白作为人体中最常见、也是目前医疗器械中常用胶原蛋白, 是异源三聚体结构( $\alpha 1[I]2\alpha 2[I]$ )<sup>[16]</sup>, 西北大学范代娣团队将人胶原蛋白片段hCOL1A1与胰岛素基因insulin融合表达, 利用毕赤酵母摇瓶发酵实现了300 mg/L的产量, 且pH值、热稳定性均有一定的提升<sup>[17]</sup>, 杨晶等<sup>[18]</sup>利用大肠杆菌生产重组类人I型胶原蛋白, 产量达520 mg/L, 且能有效促进

小鼠纤维细胞3T3细胞的增殖。当前, 国家响应重组胶原蛋白原材料和创面敷料的管理, 包括国家药监局发布关于征求《重组人源化胶原蛋白》行业标准意见, 推动了市场医疗器械等产业高质量发展, 鼓励重组人源化胶原蛋白新型生物材料的研发创新。

本文选取了来自I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的hCOL1A1截短片段, 其中肽段743-880被证明能有效促进人真皮成纤维细胞的胶原合成与伤口愈合<sup>[19]</sup>。在N端融合了SUMO标签蛋白, 能促进了重组蛋白的可溶性表达, 有效地避免重组胶原蛋白水解及聚集情况<sup>[20]</sup>。构建了SUMO-hCOL1A1融合蛋白的大肠杆菌表达体系, 通过表达条件的优化、5L发酵罐分批补料发酵、Ni-NTA亲和层析纯化、离子交换层析纯化等方法, 有效地实现的hCOLA1蛋白的小试放大生产及多种易于放大的纯化方法的开发, 为hCOL1A1的进一步开发利用提供参考, 为重组胶原蛋白大规模生产提供借鉴意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

*E. coli* Top10作为质粒扩增的宿主菌, *E. coli* BL21 (DE3)作为表达目的基因的宿主菌, 均由华南理工大学生物科学与工程学院微生物酶学实验室保存, SUMO基因序列来源于GenBank, 氨基酸序列号: AVL26008.1, 基因hCOL1A1 DNA序列源自于中华生物医学研究院福活因子产品系列, GenBank氨基酸序列号: WOZ30155.1, pET21a (+)购自南京金斯瑞生物科技有限公司。

### 1.1.2 主要试剂及培养基

标准分子量蛋白质 Marker、PCRMix、DNAMarker, 均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒, Magen 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 购自上海捷瑞生物工程有限公司; 氨苄青霉素(Ampicillin)、异丙基- $\beta$ -D- 硫代半乳糖苷(IPTG), 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I, 购自 TaKaRa 公司; TEV 蛋白酶, 碧云天生物有限公司; 其余常用试剂均为国产分析纯。

氨苄青霉素母液: 100 mg/mL, 工作质量浓度 50~100  $\mu$ g/mL, 0.22  $\mu$ m 滤膜除菌; IPTG 母液: 1 mg/mL, 0.22  $\mu$ m 滤膜除菌, -20  $^{\circ}$ C 低温保存; 平衡缓冲液 Buffer A1: 20 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 Tris, 500 mmol/L 氯化钠, pH 值 7.5; 洗脱缓冲液 Buffer B1: 20 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 Tris, 500 mmol/L 氯化钠, 500 mmol/L 咪唑, pH 值 7.5; 平衡缓冲液 Buffer A2: 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 值 7.5; 洗脱缓冲液 Buffer B2: 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 mol/L NaCl, pH 值 7.5; LB 培养基(g/L): 5 g 酵母提取物, 10 g 胰蛋白胨, 10 g 氯化钠; 发酵培养基(g/L): 20 g/L 酵母提取物, 10 g/L 胰蛋白胨, 13.5 g/L 磷酸二氢钾, 1 g/L 硫酸镁, 8 g/L 甘油; 补料培养基(g/L): 80 g/L 酵母提取物, 40 g/L 胰蛋白胨, 13.5 g/L 磷酸二氢钾, 4 g/L 硫酸镁, 400 g/L 甘油。培养基均经 115  $^{\circ}$ C, 20 min 灭菌处理。

### 1.2 仪器与设备

恒温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; Eppendorf 5804R 型高速冷冻台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; UV-2350 型分光光度计, UNICO 公司; AKTA 蛋白纯化系统, 美国通用电气公司; Ni Focurose 6FF (IMAC) 5 mL 预装柱, 武汉汇研生物科技有限公司; UniSP-50XS 阳离子层析柱, 苏州纳微科技股份有限公司; SOURCE 30Q (GE/Cytiva); 超声破碎仪, 宁波新芝科技股份有限公司; 5 L 全自动通气搅拌发酵罐, 迪必尔生物工程有限公司。

### 1.3 实验与方法

#### 1.3.1 重组表达质粒 pET21a (+)-SUMO-hCOL1A1 的构建与鉴定

重组 I 型人源化胶原蛋白基因 (Recombinant Humanized Type I Collagen, rhCOL1A1), 在其 N 端融合 SUMO 标签蛋白, 两序列之间插入酶切位点

*Bam*HI 及氨基酸序列 ENLYFQ  $\uparrow$  S (“ $\uparrow$ ”为蛋白酶切割处), 为蛋白酶 TEV Protease (Tobacco Etch Virus Protease, 烟草蚀纹病毒蛋白酶) 识别序列位点。为实现 Ni-NTA 亲和层析纯化, 融合蛋白带有 His 标签, 全序列氨基酸经大肠杆菌密码子优化, 委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 基因克隆至质粒 pET21a (+) 的 *Nde* I 与 *Xho* I 酶切位点中, 重组质粒 pET21a (+)-SUMO-hCOL1A1。

将重组质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 并涂布至含氨苄青霉素的 LB 平板中, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 抗性筛选转化子, 并通过上下游引物 T7-F: TAATACGACTCACTATAGG, 引物 T7-R: CAAAAAACCCTCAAG, PCR 扩增转化子, PCR 溶液体系: PCRMIX 4.8  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 4.8  $\mu$ L, 单菌落模版, 上游引物 0.2  $\mu$ L, 下游引物 0.2  $\mu$ L, 总体积为 10  $\mu$ L。PCR 程序为: 预热 94  $^{\circ}$ C, 5 min, 变性 94  $^{\circ}$ C, 30 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C, 1 kb/min, 复性 72  $^{\circ}$ C, 10 min, 保温, 16  $^{\circ}$ C, 其中变性、退火、延伸各 30 个循环。结合 *Nde* I 与 *Xho* I 内切酶双酶切质粒 pET21a (+)-SUMO-hCOL1A1, 将结果正确的转化子送往广州擎科生物有限公司测序。

#### 1.3.2 重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的摇瓶表达

挑选鉴定正确的 BL21(DE3)/pET21a(+)-SUMO-hCOL1A1 单菌落, 接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基 (10 mL) 中, 于 37  $^{\circ}$ C, 220 r/min 的摇床中过夜培养。移取活化的种子液, 按 1% (V/V) 接种量至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 500 mL 摇瓶装液量为 20% (V/V), 于 37  $^{\circ}$ C, 220 r/min 的摇床中培养 OD<sub>600</sub> 至 0.6~0.8, 添加终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达, 16  $^{\circ}$ C, 220 r/min 条件下诱导表达 12~16 h, 同时培养 BL21 (DE3) 对照菌株。

将上述发酵液在 4  $^{\circ}$ C, 6 000 r/min 条件下离心 10 min, 收集菌体并用 Buffer A1 洗涤菌体。将重悬菌液置于冰浴条件下, 以 6 mm 变幅杆, 30% 频率, 超声 3 s, 间隔 3 s, 超声破碎 20 min, 细胞裂解物于 4  $^{\circ}$ C, 10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清和细胞碎片, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

#### 1.3.3 重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的表达条件优化

##### 1.3.3.1 诱导剂浓度优化

参考 1.3.2 的小试表达方案, 诱导时每组分别加入不同浓度的 IPTG (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L), 在 16  $^{\circ}$ C, 220 r/min 条件下诱导表达 12~16 h。收集不同组分进行 SDS-PAGE 电泳, 分析不同诱导剂浓

度下重组蛋白的表达量。

### 1.3.3.2 诱导温度优化

参考本文 1.3.2 的小试表达方案，诱导时添加 0.4 mmol/L 的 IPTG，且每组分别以不同的诱导温度（16、20、25、30 °C），在 220 r/min 条件下诱导表达 12~16 h。收集不同组分进行 SDS-PAGE 电泳，分析不同诱导温度下重组蛋白的表达情况。

### 1.3.4 重组表达菌株 5 L 罐的分批补料发酵

#### 1.3.4.1 种子液准备

参考本文 1.3.2 的小试表达方案，准备一级、二级种子液。

#### 1.3.4.2 5L 发酵罐的分批补料发酵

将培养至对数生长期的二级种子液以 5% (V/V) 接种量接种至 5L 发酵罐中，并加入终质量浓度为 100 μg/mL 的氨苄青霉素，最终装液量为 2 L 的基础培养基，培养期间流加氨水控制 pH 值至 6.8~7.0。初始培养温度 37 °C，搅拌转速 200~800 r/min，空气流速 1 800~2 000 L/h，溶氧 30%~50%，罐压 0.04~0.06 MPa。待营养物质耗尽后，溶氧上升，控制溶氧为 30%，联动转速 200~800 r/min，控制补料速度 4.5 g/h，连续流加补料。待菌体处于对数生长期时开始诱导：温度 25 °C、0.4 mmol/L IPTG，诱导期间每 3 h 取菌液留样，稀释各组分 OD<sub>600</sub>=20，SDS-PAGE 检测诱导表达情况。

### 1.3.5 重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的酶切与纯化

收集发酵破碎液的蛋白上清，经 0.45 μm 滤膜过滤后，以 2 mL/min 的流速，加载上清至清洗完毕且系统平衡的 AKTA 蛋白纯化系统，于 4 °C 收集蛋白流穿液、洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析纯化情况。酶切条件按照碧云天 TEV 酶使用说明书进行。

### 1.3.6 蛋白浓度测算方法

通过 SDS-PAGE 分析细胞各组分重组蛋白的表达情况，Bradford 法测定样品蛋白浓度，再利用软件 Image J 分析电泳条带，通过电泳条带的面积和灰度值，测算目的蛋白所占比例。

### 1.3.7 数据分析方法

使用 GraphPad Prism 9 进行图形和图表的制作，并进行数据分析。特定的图像分析使用 Image J 软件完成。蛋白浓度等数据测算均进行了至少三次独立实验，以确保结果的可重复性和可靠性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组 pET21a (+)-SUMO-hCOL1A1 表达载体的构建及鉴定

研究表明，从分子水平改善胶原蛋白亲水性，可提升其用于组织材料工程中易于使用<sup>[21]</sup>，解决重组胶原蛋白在宿主中表达受限的和表达量低的问题<sup>[22]</sup>，因此在 hCOL1A1 的 N 端融合了 SUMO 蛋白。以单菌落 BL21(DE3)/pET21a(+)-SUMO-hCOL1A1 为模板，PCR 扩增目的基因筛选阳性转化子，琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示，4 号泳道 1 500 bp 上方出现单一明亮的条带，与理论值相符；此外，重组质粒经 *Nde* I 与 *Xho* I 酶双酶切后，产生两条明显的特异性条带，分别对应目的基因 SUMO-hCOL1A1 的 1 442 bp 与质粒双酶切后片段 5 365 bp，条带大小与胶图条带相对应，结合测序结果，证明重组菌株构建成功。

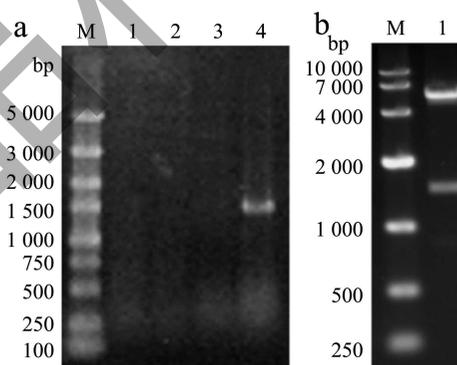


图 1 重组表达菌株验证

Fig.1 Identification of recombinant strain of BL21(DE3)/pET21a(+)-SUMO-hCOL1A1

注：a 图为菌落 PCR 验证阳性转化子图，M 表示 5 000 bp 标准 DNA 电泳 Marker，1~4 表示 BL21 (DE3) 转化子菌落 PCR 验证。b 图为 pET21a(+)-SUMO-hCOL1A1 双酶切验证，M 表示 10 000 bp 标准 DNA 电泳 Marker，1 表示质粒双酶切验证条带。

### 2.2 重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的摇瓶表达

参照本文 1.2.2 的方法，对 BL21 (DE3) /pET21a (+)-SUMO-hCOL1A1 工程菌进行 500 mL 摇瓶培养，装液量为 20% (V/V)，经 IPTG 诱导 12 h、离心收集菌体、超声破碎后，SDS-PAGE 分析重组蛋白表达。同时发酵 BL21 (DE3) 菌株作为对照组，结果如图 2 所示。工程菌经低温诱导

培养, SUMO-hCOL1A1 主要以可溶形式存在于细胞裂解物的上清中。经中华生物医学研究院确认, hCOL1A1 理论分子量大小为 31.8 ku, 考虑到 SUMO 大小为 14.5 ku, 重组蛋白 SUMO-hCOL1A1 的理论分子大小应为 46.3 ku, 而由于 SUMO 的共价修饰和其带电情况 ( $pI=4.97$ ), 且融合蛋白由于亲水氨基酸占比较大, 因此 PAGE 胶图可能显示分子量偏大<sup>[23]</sup>。通过与对照组相比, 在工程菌细胞破碎上清液中, 55~65 ku 处出现一明显条带, 表明重组 SUMO-hCOL1A1 能以可溶形式在大肠杆菌中成功表达, 少部分为沉淀形式。

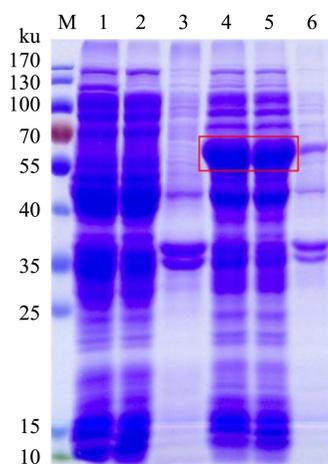


图 2 重组蛋白 SUMO-hCOL1A1 表达情况

Fig.2 Expression of recombinant protein of SUMO-hCOL1A1

注: M 代表标准蛋白电泳 Marker, 1~3 代表 BL21(DE3) 破碎液全蛋白、上清、沉淀, 4~6 代表 BL21(DE3)/pET21a(+)-SUMO-hCOL1A1 破碎液全蛋白、诱导后上清、诱导后沉淀。

### 2.3 重组蛋白 SUMO-hCOL1A1 的表达条件优化

重组蛋白生产期间, 诱导温度和诱导剂浓度至关重要, 它决定了如何在更短时间的培养时间内收获更多的蛋白。因此, 在菌株对数生长期即  $OD_{600}=0.6\sim 0.8$  时, 设置了添加不同梯度的 IPTG (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L) 诱导重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的表达, 通过对比 BL21 (DE3) 对照组菌株、未添加诱导剂前 BL21 (DE3) /pET21a (+) -SUMO-hCOL1A1 菌株的表达情况, 如图 3。结合 SDS-PAGE 和 Image J 分析, 相较于 0.4 mmol/L 的 IPTG, 添加终浓度为 0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 均无表达量的明显提升, 因此确定 0.4 mmol/L 的 IPTG 为最佳诱导浓度。

在菌株对数生长期, 添加 IPTG 后, 通过设置

不同的诱导温度 (30、25、20、16 °C), 诱导重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的表达, 通过对比 BL21 (DE3) 对照组菌株、未诱导前 BL21 (DE3) /pET21a (+) -SUMO-hCOL1A1 菌株的表达情况, 如图 3。结合 Image J 分析, 确定最佳诱导温度为 25 °C。

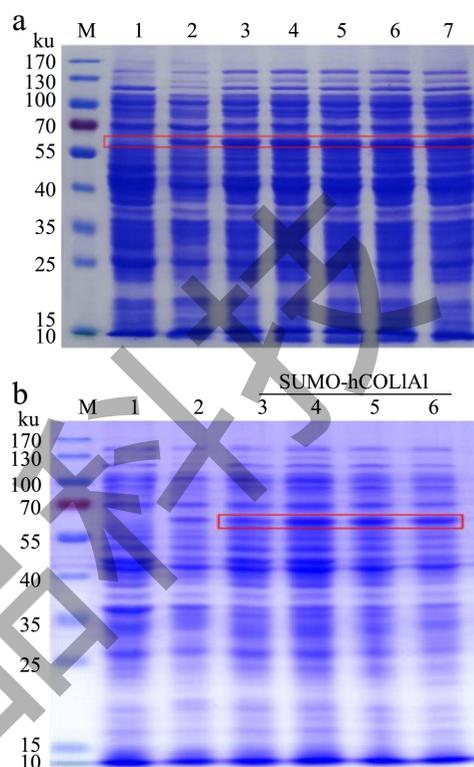


图 3 重组蛋白 SUMO-hCOL1A1 表达条件的优化

Fig.3 The optimization of the expression conditions for the recombinant protein SUMO-hCOL1A1

注: a 图为重组蛋白的诱导剂浓度优化, M 代表标准蛋白电泳 Marker, 1~2 代表 BL21(DE3) 对照菌株、未诱导菌株, 3~7 代表 IPTG 诱导浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的菌株表达情况。b 图为重组蛋白的诱导温度优化, M 代表标准蛋白电泳 Marker, 1~2 代表 BL21(DE3) 对照菌株、未诱导菌株, 3~6 代表诱导温度 30、25、20、16 °C 的菌株表达情况。

### 2.4 重组菌株 BL21(DE3)/pET21a(+)-SUMO-hCOL1A1 的 5L 罐的分批补料发酵

Tang 等<sup>[24]</sup> 通过 ALH、P4H 酶与胶原蛋白的共表达, 结合 10L 发酵罐的高密度发酵, 实现了重组胶原蛋白在大肠杆菌中的可溶表达, 最终发酵罐产量达 260 mg/L, 表明重组胶原的工业化生产与实现产品转化的潜力。因此, 为验证工程菌株的放大稳定性及蛋白表达情况, 对菌株进行了 5 L 发酵罐的分批补料发酵。在诱导温度 25 °C, IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L 的诱导条件下, 经 17 h 诱导, 培

养时长为 24 h, 菌密度  $OD_{600}$  达 61.73, 其生长情况如图 4a 所示。收集不同培养阶段的菌体, 经破碎收集上清, 经 Bradford 法测定总蛋白浓度以及结合 Image J 灰度分析, 重组蛋白 SUMO-hCOL1A1 的在 5 L 发酵罐中产量最终达 1.43 g/L, 为 hCOL1A1, 见图 4b。

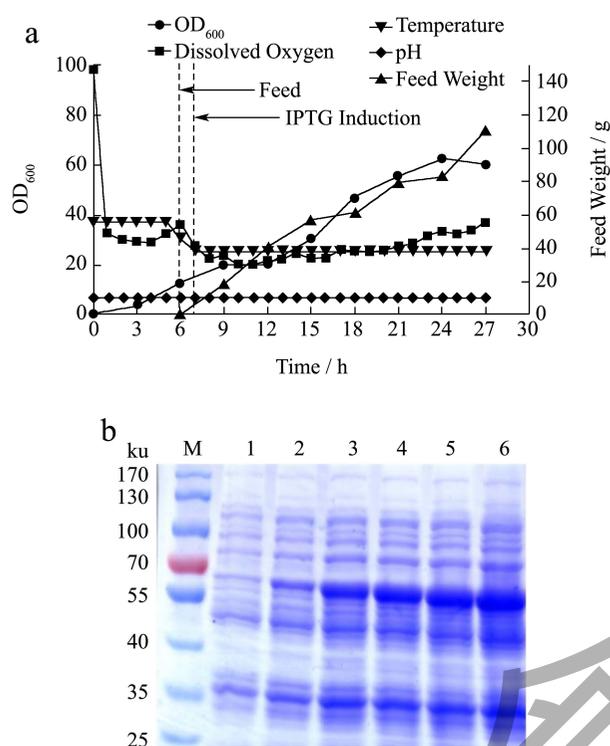


图 4 重组菌株的 5 L 高密度发酵过程监测图

Fig.4 5 L high-density fermentation process monitoring of the recombinant strain

注: a 图为重组菌株 5 L 发酵罐的发酵过程图, b 图为重组菌株不同发酵时间点的样品 SDS-PAGE 分析。M 代表标准蛋白电泳 Marker, 1~6 代表培养 10、13、16、19、22、24 h 的菌株破碎上清液(样品均稀释至  $OD_{600}=20$ )。

## 2.5 重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的纯化

### 2.5.1 重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的镍离子亲和层析纯化

本文使用 Ni-NTA 亲和层析纯化重组 SUMO-hCOL1A1, 这种纯化策略不仅可用于验证重组蛋白的存在, 还可实现高纯度 SUMO-hCOL1A1 蛋白的生产。测试了不同咪唑洗脱条件下的蛋白纯化情况, SDS-PAGE 电泳结果如图 5a 所示, 观察到在 50 mmol/L 咪唑浓度下, 大量杂蛋白被有效洗脱。当咪唑浓度提升至 100 mmol/L 以上时, 目标蛋白 SUMO-hCOL1A1 开始从柱中洗脱。在 200 mmol/L

咪唑浓度下, 实现了目标蛋白的初步纯化。通过对 SDS-PAGE 条带进行灰度扫描分析, 纯化后的蛋白纯度超过 50%, 且蛋白分子量与预期相符。

### 2.5.2 重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的阴离子交换层析纯化

为了提高 TEV 蛋白的酶切效果, 在二次纯化时使用了 G25 凝胶层析除盐, 将含有咪唑的缓冲液置换为缓冲液 20 mmol/L  $Na_2HPO_4$ , pH 值 7.5。接下来, 通过 TEV 酶切分离 SUMO 和 hCOL1A1 蛋白, 由图 5b 的 1 号泳道可知, 在 15~25 ku 和约 40 ku 分子量处有明显的两条条带, 分别为 SUMO 和 hCOL1A1 蛋白, Yao 等<sup>[25]</sup>在表达 I 型类人胶原蛋白时, SDS-PAGE 结果显示条带较理论分子量大, 给出的理由是可能由于多肽链之间的多聚化作用, 此外也有文献表明胶原蛋白及明胶类物质在 SDS-PAGE 中的表现分子量比其真实分子量高 1~4 倍<sup>[26,27]</sup>, 因此这也可能是导致 hCOL1A1 蛋白实际分子量较大的原因。

在本研究中, 重组融合蛋白 SUMO-hCOL1A1 (理论等电点  $pI=5.69$ ) 被设计为通过 TEV 蛋白酶的作用, 将 SUMO 标签 ( $pI=4.97$ ) 与 hCOL1A1 蛋白 ( $pI=9.0$ ) 分离。利用蛋白等电点的差异, 采用阴离子交换层析进行后续纯化。在这一过程中, 等电点  $pI$  低于 7.5 的蛋白质(如 SUMO 标签)因带负电荷而被阴离子交换柱吸附, 而 hCOL1A1 蛋白由于其理论等电点  $pI$  为 9.0, 大于 7.5, 故未被柱吸附并在流穿液中得以收集。

通过 SDS-PAGE 电泳分析(如图 5b 所示), 在 2 号泳道中观察到目的蛋白 hCOL1A1 的条带。通过对 SDS-PAGE 条带进行灰度扫描分析, 计算得到目的蛋白 hCOL1A1 的纯度超过 95%。这一结果表明, 通过 TEV 蛋白酶切和阴离子交换层析的组合纯化策略, 有效地验证并实现了高纯度的 hCOL1A1 蛋白的纯化。

### 2.5.3 重组 SUMO-hCOL1A1 蛋白的阳离子交换层析纯化

本研究还探讨了利用阳离子交换层析分离目的蛋白的策略。在此方法中, 等电点  $pI$  低于 7.5 的蛋白(如 SUMO 蛋白)因带负电荷而无法与阳离子交换柱的填料结合, 从而存在于流穿液中。相反, hCOL1A1 蛋白由于其理论等电点  $pI$  为 9.0, 大于 7.5, 因此能够有效地结合至阳离子交换柱。实验中发现, 当 NaCl 浓度达到 0.2 mol/L 时, 可以实现

hCOL1A1 蛋白的有效洗脱。

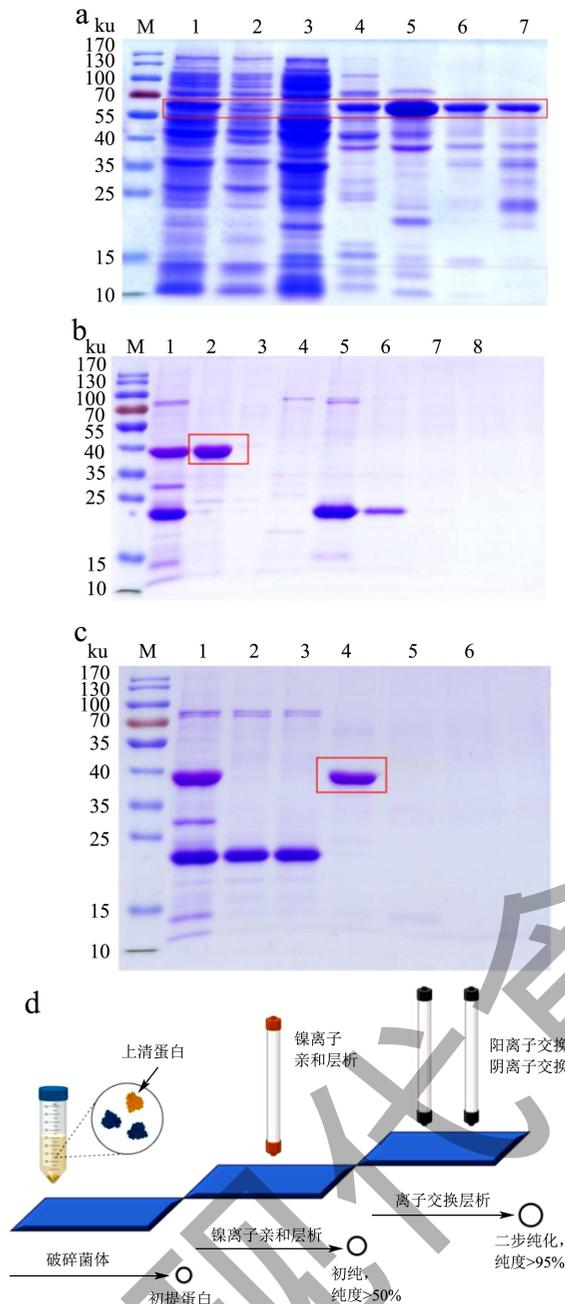


图5 重组蛋白 SUMO-hCOL1A1 的纯化结果

Fig.5 Purification of recombinant protein SUMO-hCOL1A1

注：图 a 为重组蛋白 SUMO-hCOL1A1 的镍离子亲和层析结果，M 代表标准蛋白电泳 Marker，1~7 代表重组 SUMO-hCOL1A1 的上清、流穿液、50、100、175、200、500 mmol/L 咪唑洗脱液。图 b 为阴离子交换层析纯化结果，M 代表标准蛋白电泳 Marker，1~3 代表重组 SUMO-hCOL1A1 酶切上清、流穿液、流穿液，4~8 代表 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L NaCl 洗脱液。图 c 阳离子交换层析纯化结果，M 代表标准蛋白电泳 Marker，1~3 代表重组 SUMO-hCOL1A1 酶切上清、流穿液、流穿液，4~6 代表 0.2、0.4、0.6 mol/L NaCl 洗脱液。图 d 为纯化流程图。

通过 SDS-PAGE 电泳分析（如图 5c 所示）及对应条带的灰度扫描分析，计算得出采用阳离子交换层析后 hCOL1A1 蛋白的纯度达到或超过 95%。hCOL1A1 的纯化策略在图 5d 中有详细展示。

综上所述，本研究通过摇瓶及发酵罐水平的表达、基于 His 标签的 Ni-NTA 亲和层析纯化、基于 TEV 蛋白酶的蛋白分离、以及基于蛋白等电点性质的阳离子和阴离子交换层析方法，成功验证并实现了高纯度 hCOL1A1 蛋白的生产，为重组 hCOL1A1 蛋白的纯化应用提供了有效的策略。

### 3 结论

本实验成功构建了 BL21/pET21a (+) -SUMO-hCOL1A1 重组蛋白工程菌，通过与 SUMO 标签融合，实现了重组 I 型人源化胶原蛋白 hCOL1A1 的可溶表达。通过对工程菌株进行了培养条件（诱导温度、诱导剂浓度）的优化，确定了 25 °C，0.4 mmol/L IPTG 的最优诱导表达条件，在 5L 分批补料发酵体系下，融合蛋白 SUMO-hCOL1A1 产量可达 1.43 g/L，所开发的两种纯化工艺，即融合蛋白经 Ni-NTA 亲和层析、酶切、阴、阳离子交换层析两步纯化，hCOL1A1 蛋白纯度可达 95% 以上。上述研究实现了重组 I 型人源化胶原蛋白（产品名称：福活因子）的可溶生产和纯化，为目前生物法合成重组胶原蛋白的放大生产提供示例，促进 hCOL1A1 在食品、化妆品、医疗等领域的进一步开发。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] SHOULDERS M D, RAINES R. Collagen structure and stability [J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78: 929-958.
- [3] LEVA G, RUI L, MELINDA J. Collagen structure-function relationships from solid-state Nmr spectroscopy [J]. Accounts of Chemical Research, 2018, 51(7): 1621-1629.
- [4] SJAYACHANDRAN V, SUKUMARAN A, SE-KWON K, et al. Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: areview [J]. Marine Drugs, 2017, 15(5): 143.
- [5] EVAN D, WILLIAM S, ELENA G. Sources of collagen for biomaterials in skin wound healing [J]. Bioengineering (Basel), 2019, 6(3): 56.
- [6] HE Y, HOU Z M, WANG J N, et al. Assessment of biological properties of recombinant collagen-hyaluronic acid composite scaffolds [J]. International Journal of

- Biological Macromolecules, 2020, 149: 1275-1284.
- [7] MARIA I, LAURA G, MIRNA L. Collagen: a review on its sources and potential cosmetic applications [J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2018, 17(1): 20-26.
- [8] 潘家豪,潘炜松,邱健,等.重组胶原蛋白表达体系研究进展[J].合成生物学,2023,4(4):808-823.
- [9] PAL G K, SURESH P V. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016, 37: 201-215.
- [10] LIU D S, WEI G M, LI T C, et al. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin [J]. Food Chemistry, 2015, 172: 836-843.
- [11] XU N, PENG X L, LI H R, et al. Marine-derived collagen as biomaterials for human health [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 702108.
- [12] ZHANG Z X, NONG F T, WANG Y Z, et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity [J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 191.
- [13] TRIPATHI N K, SHRIVASTAVA A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 420.
- [14] JOHN A, PENG Y, VERONICA G, et al. Collagens as biomaterials [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2009, 20: 3-8.
- [15] XIANG Z X, GONG J S, LI H, et al. Heterologous expression, fermentation strategies and molecular modification of collagen for versatile applications [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(21): 5268-5289.
- [16] SEO W Y, KIM J H, BAEK D S, et al. Production of recombinant human procollagen type I C-terminal propeptide and establishment of a sandwich ELISA for quantification [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15946.
- [17] MI Y, GAO Y, FAN D, et al. Stability improvement of human collagen  $\alpha 1(I)$  chain using insulin as a fusion partner [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2018, 26(12): 2607-2614.
- [18] 杨晶,余洁莹,王蒙,等.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[J].现代食品科技,2016, 32(2):60-65.
- [19] HWANG S J, KIM S H, SEO W Y, et al. Effects of human collagen  $\alpha$ -1 type I-derived proteins on collagen synthesis and elastin production in human dermal fibroblasts [J]. BMB Rep, 2021, 54(6): 329-334.
- [20] TADAS P, CARSTEN S, TAUSEEF R. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems [J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 497: 303-317.
- [21] YUNJE C, SVETLANA G, JEFFREY P, et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations [J]. Science, 1994, 265: 346-355.
- [22] 傅容湛,范代娣,杨婉娟,等.重组胶原蛋白的产业发展历程和生物医学应用前景展望[J].生物工程学报,2022, 38(9):3228-3242.
- [23] PASCAL P, MARTIN J. Improving the heterologous production of fungal peroxygenases through an episomal *Pichia pastoris* promoter and signal peptide shuffling system [J]. Acs Synthetic Biology, 2021, 10(6): 1360-1372.
- [24] TANG Y P, YANG X L, HANG B J, et al. Efficient production of hydroxylated Human-like collagen via the co-expression of three key genes in *Escherichia coli* Origami (DE3) [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(7): 1458-1470.
- [25] 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]. The Journal of Biochemistry, 2004, 136(5): 643-649.
- [26] BUTKOWSKI R J, NOELKEN M E, HUDSON B G. Estimation of the Size of Collagenous Proteins by Electrophoresis and Gel Chromatography [M]. Methods in Enzymology, Academic Press, 1982.
- [27] WERTEN M W, WISSELINK W H, JANSEN-VAN DEN BOSCH T J, et al. Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris* [J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2001, 14(6): 447-454.