应用促溶标签提高重组III型人源化胶原蛋白在大肠杆菌中的表达效率

李岩哲[1]，敬丹[1]，时苗均[1]，薛威[1]，翟征远[1,2]，谢冰寒[1]，宋灿[1]，陈历水[1]，许力[1*]

（1.中原食品实验室，河南漯河 462300）（2.中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京 100083）

摘要：重组胶原蛋白在生物材料和生物医学等领域具有广泛应用前景，III 型胶原蛋白对人体皮肤紧致度和弹性维持起到关键作用，为了提高其产量，加速产业化进程，需要构建高产工程菌株，建立高效下游重组胶原蛋白分离纯化工艺。研究选取人 III 型胶原蛋白成熟肽链核心功能区，以（Gly-X-Y）为基本单元进行人工基因优化合成。构建了 3 株工程菌：不含促溶标签的 pET28a-COL3A1/BL21（DE3）、在 N 端分别融合谷胱甘肽 S-转移酶（GST）和小分子泛素样修饰蛋白（SUMO）标签的 pGEX-4T-1-COL3A1/BL21（DE3）和 pET-SUMO-COL3A1/BL21（DE3）。结果表明，3 株工程菌均能实现可溶性表达，可溶性表达比例分别为 14.09%、19.22% 和 24.85%。选择含 SUMO 标签的工程菌在 3 L 发酵罐中诱导 30 h 后表达量最高达到 1.02 g·L^{-1}。经分离纯化高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）检测重组胶原蛋白纯度达 95% 以上，液相色谱－质谱联用仪（Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LC-MS）测定分子量为 31.2 kDa。本研究应用 SUMO 标签提高重组胶原蛋白的表达效率，实现了 3 L 发酵罐小试和分离纯化，为重组胶原蛋白规模化生产和应用提供了理论基础。

关键词：重组人源化 III 型胶原蛋白；促溶标签；大肠杆菌；高密度发酵；蛋白纯化

文章编号：1673-9078(2026)10-39-46 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1038

Application of Solubility-enhancing Tags to Enhance the Expression Efficiency of Recombinant Humanized Type III Collagen in *Escherichia coli*

LI Yanzhe[1], JING Dan[1], SHI Miaojun[1], XUE Wei[1], ZHAI Zhengyuan[1,2], XIE Binghan[1], SONG Can[1], CHEN Lishui[1], XU Li[1*]

(1.Food Laboratory of Zhong Yuan, Luohe 462300, China) (2.College of Food Science&Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Recombinant collagen is recognized as having broad application prospects in biomaterials and biomedicine. Type III collagen plays a critical role in maintaining human skin firmness and elasticity. To enhance its industrial production output and efficiency, high-yield engineered bacterial strains and efficient downstream purification processes for recombinant collagen must be established. The core functional region of the human Type III collagen mature peptide chain was selected based on the (Gly-X-Y) repeating unit, and its gene sequence was artificially optimized and synthesized. Three engineered *Escherichia coli* strains were constructed: pET28a-COL3A1/BL21(DE3) (without a solubility-enhancing tag), pGEX-4T-1-COL3A1/BL21(DE3) (fused with an N-terminal glutathione S-transferase (GST) tag), and pET-SUMO-COL3A1/BL21(DE3) (fused with an N-terminal small ubiquitin-like modifier (SUMO) tag). Soluble expression was achieved in all three strains, with soluble expression ratios of 14.09%, 19.22%, and 24.85%, respectively. The strain harboring the SUMO tag was selected for scale-up. Following 30 h of induction in a 3 L fermenter, the highest expression level reached was 1.02 g·L^{-1}. After separation and purification, the recombinant collagen showed a purity exceeding by high-performance liquid chromatography and a molecular weight of 31.2 kDa by liquid chromatography-mass

收稿日期：2025-07-25；修回日期：2025-09-26；接受日期：2025-09-28

基金项目：河南省重点研发专项（241112110500）

作者简介：李岩哲（1997-），男，硕士，研究实习员，研究方向：微生物、分子生物学；E-mail：961838604@qq.com

通讯作者：许力（1989-），女，博士，助理研究员，研究方向：微生物、分子生物学；E-mail：15827236778@163.com

spectrometry. This study demonstrates that the SUMO tag markedly enhances the expression efficiency of recombinant collagen. A pilot-scale purification process was successfully established using the 3 L fermenter, providing a theoretical foundation for the scaled-up production and application of recombinant collagen.

Key words: recombinant humanized type III collagen; solubility-enhancing tags; *Escherichia coli*; high-density fermentation; protein purification

引文格式：

李岩哲,敬丹,时苗均,等.应用促溶标签提高重组III型人源化胶原蛋白在大肠杆菌中的表达效率[J].现代食品科技,2026,42(10):39-46.

LI Yanzhe, JING Dan, SHI Miaojun, et al. Application of solubility-enhancing tags to enhance the expression efficiency of recombinant humanized type III collagen in *Escherichia coli* [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 39-46.

胶原蛋白（Collagen）在人体中含量丰富，占人体蛋白质三分之一[1]，占皮肤干重的四分之三，主要通过蛋白多聚体形成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[2]。人体内不同类型的胶原蛋白有 29 种。皮肤中主要存在 I、II、IV、VII、和 XVII 等型胶原蛋白，其中 I 型和 III 型胶原蛋白含量最多，分别占皮肤的 80%~85% 和 10%~15%[3-5]。

胶原蛋白来源有传统动物提取和基因工程等方式，动物来源的胶原蛋白存在单体分离难、氨基酸序列与天然胶原蛋白差异大，且有病毒传播风险等缺点。Toman 等[6]将胶原蛋白基因片段和乳腺酪蛋白特异性启动子基因片段共同转化入小鼠分泌型乳腺，生产出 8 mg·mL^{-1} 乳汁的人 I 型胶原蛋白。Adachi 等[7]将转基因蚕的丝腺分泌表达人 III 型胶原蛋白片段，产量为蚕茧干重的 1%。Stein 等[8]利用烟叶表达人 I 型胶原蛋白，产量为 200 mg·kg^{-1} 鲜叶。这些研究显示哺乳动物、昆虫及植物表达体系存在成本高、周期长，难以满足产业化需求，相比之下微生物表达系统具有成本低、速度快、技术相对简单、可进行高密度发酵等优点，是工业化生产的首选方式。

随着重组胶原蛋白及其衍生物的市场需求量增加，更多研究者开始重视其产业化生产及作用机制的研究[9]。在原核表达体系中，Rutschmann 等[10]表达分子量为 38 kDa 的 III 型重组胶原蛋白，其摇瓶产量达到 90 mg·L^{-1}。刘苏[11]利用大肠杆菌表达分子量为 120 kDa 的 I+III 型融合胶原蛋白，5 L 发酵罐产量达到 0.8 g·L^{-1}。徐兰举等[12]对人 III 型胶原蛋白的基因序列进行改造，构建了能够异源合成 70 kDa 的 III 型重组胶原蛋白大肠杆菌工程菌，在 5 L 发酵罐产量达到 3.5 g·L^{-1}。在真核表达体系中，Zhin 等[13]利用毕赤酵母表达分子量为 27 kDa 的 III 型重组胶原蛋白，5 L 发酵罐产量达到 1.05 g·L^{-1}。Li 等[14]以酵母为底盘细胞，表达了分子量为 130 kDa 的 III 型重组胶原蛋白，30 L 发酵罐产量达到 4.68 g·L^{-1}。这些研究结果揭示了利用微生物合成重组胶原实现工业化生产及产品转化的潜力。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，通过基因改造、高密度培养，能大大降低重组胶原蛋白的生产成本，提升其在食品、化妆品、生物材料领域的潜力。

本研究所用的谷胱甘肽 S-转移酶（GST）标签蛋白是一种 26 kDa 的亲和标签，能与其特异性的底物还原型谷胱甘肽（GSH）结合，广泛应用于融合蛋白表达与分离纯化中，其优点是能够增加蛋白的可溶性，有助于提高蛋白稳定性，可在温和、非变性条件下洗脱，较好的保留蛋白的抗原性和生物活性。小分子泛素样修饰蛋白（SUMO）标签蛋白，约 11.5 kDa，被广泛应用于原核表达系统，该标签能够促进靶蛋白可溶性表达，提高融合蛋白的表达量，可以作为分子伴侣，促进蛋白质正确折叠。本研究通过 3 L 发酵罐初步进行高密度发酵扩大培养，检测重组胶原蛋白产量，借助超滤及亲和层析等策略提高蛋白纯度，利用 HPLC、质谱分析检测蛋白纯度及分子量，有效地实现了重组胶原蛋白的小试生产及纯化方法的开发，为重组胶原蛋白工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21（DE3）；pET28a 和 pGEX-4T-1 由实验室保存、pET-N-His-PreScission-SUMO，Beyotime，基因由上海生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.1.2 实验试剂

Ni 填料，GE Healthcare 公司；预制胶、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、LB 培养基索莱宝，咪唑，碧云天生物技术有限公司；蛋白上样缓冲液 4× Protein SDS PAGE Loading Buffer、DNA Marker、预染蛋白 Ladder，Takara 公司；异丙基 *β*-D-硫代半乳糖苷，Sigma 公司，考马斯亮蓝快速染液，2× Rapid Taq

Master Mix 快速 PCR 聚合酶，诺唯赞生物股份有限公司。DNA 聚合酶、限制性内切酶 NEB 公司；DNA 连接酶，赛默飞公司。

1.2 仪器

Mini Amp Plus聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；UV-2800A 紫外可见分光光度计，上海尤尼柯仪器有限公司；iBright CL1500 智能成像系统，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；SCIENTZ-IID 超声波细胞粉碎仪，宁波新芝生物；Scientz-207A 高压均质机，宁波新芝生物；NanoDrop OneC 核酸定量仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；SPARK 多功能酶标仪，德国 TECAN 公司；Mini-PROTEAN Tetra System 蛋白电泳仪器，美国 BIO-RAD 公司；Power Ease®90W 核酸电泳仪，美国 Life technologies 公司；MC-JGF-3L 台式玻璃发酵罐，北京满仓科技有限公司，H4-20KR 高速冷冻离心机，蜀科公司；ZQZY-78B 振荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；HH-6 数显恒温水浴锅，常州普天仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 目的基因的优化及合成

在 NCBI 数据库中获得人 III 型胶原蛋白 α1 链的基因序列（GenBank：AB384877.1），本研究选取 N 端结构域和与其相连的胶原三联重复区的片段序列（第 155-377 个氨基酸），对应的核酸序列进行大肠杆菌密码子优化并委托生工生物工程（上海）股份有限公司人工合成基因来开展后续的研究。该段氨基酸亲水性良好，序列其前 13 个氨基酸属于 N 端结构域，能够起到头部牵引作用，使后续氨基酸不易产生错配或缠绕，增强胶原整体的亲水性和表达效率。该段氨基酸序列为：MYDSYDVKSGVAVGGLAGYPGP AGPPGPPGPPGTSGHPGSPGSPGYQGPPGE PGQAG PSGPPGPPGAIGPSGPAGKDGESGRPGRPGERGLPG PPGIKGPAGIPGFPGMKGHRGFDGRNGEKGETGA PGLKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGRPGLP GAAGARGNDGARGSDGQPGPPGPPGTAGFPGSPG AKGEVGPAGSPGSNGAPGQRGEPGPQGHA

1.3.2 重组胶原蛋白表达载体的构建

以合成的 pUC57-COL3A1 质粒为模版，分别使用基因扩增引物扩增目的基因片段，得到 *COL3A1*。用核酸凝胶回收试剂盒切胶回收。将 pET28a、pGEX-4T-1、pET-N-His-PreScission-SUMO 载体和 PCR 扩增产物 *COL3A1* 使用 NEB 公司的限制性内切酶进行双酶切，用 T4 DNA 连接酶将酶切后的载体及 PCR 产物 *COL3A1* 进行连接，将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞内，在含有相应载体抗性的 LB 固体平板上生长，挑取转化子，使用测序引物进行菌落 PCR 鉴定。后续进行测序验证。

1.3.3 重组III型胶原蛋白工程菌株转化

利用热激法分别将测序正确的重组载体转化至 BL21（DE3）感受态细胞，涂布在含有相应抗性的 LB 固体平板上，37 ℃过夜培养，挑取单克隆，分别使用载体测序引物进行菌落 PCR 验证，检测正确后，保存菌种放置 −80 ℃冰箱备用。

1.3.4 重组菌摇瓶诱导表达

pET28a-COL3A1、pGEX-COL3A1、pET-SUMO-COL3A1，三株工程菌进行摇瓶培养，37 ℃经 IPTG 诱导 4 h，离心、超声破碎、离心取上清、BCA 法测定样品蛋白浓度，调整泳道上样蛋白量进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析重组蛋白表达情况，利用软件 ImageJ 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。

1.3.5 工程菌在3 L发酵罐中诱导表达

将 pET-SUMO-COL3A1 工程菌在含有卡那霉素的固体 LB 平板划线，37 ℃过夜培养，挑取单菌落，摇瓶过夜培养获得一级种子液。转接过夜培养获得二级种子液，按 5% 接种量接种于 3 L 发酵罐，发酵条件设置如下：温度 30 ℃，通气量 1.5 L·min^{-1}，搅拌转速初始为 200 r·min^{-1}，pH 值通过流加氨水自动调节，发酵液 pH 值保持在 6.9 左右，控制溶解氧（DO）在 10%~30%。培养至生长对数中期时，加入终浓度为 0.1 mmol·L^{-1} IPTG 诱导。加入诱导剂后，分别取诱导 4、6、16、20、24、30、40、44 h 的发酵液进行蛋白电泳检测。利用全自动化学发光成像系统进行拍照记录，用 ImageJ 软件对目的蛋白条带进行灰度分析，计算重组 III 型胶原蛋白的表达量。

1.3.6 重组III型胶原蛋白亲和层析纯化

取发酵液离心收集菌体，加入 PBS 重悬混匀后高压均质破碎，将均质破碎的菌液在 4 ℃、13 000× g 离心 30 min，取上清液，通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤。将均质后的滤液装进提前平衡好的 Ni SepharoseTm 6 Fast Flow 亲和填料轻轻混匀，置于 4 ℃往复式摇床轻摇 1 h 后，将混合物转移至纯化柱内，收集流穿液，加入等柱体积的结合液洗涤填料 2~3 次，收集洗涤液，之后加入等柱体积的含有不同咪唑浓度的洗脱液进行分级洗脱，收集洗脱制备 SDS-PAGE 蛋白电泳样品。选蛋白纯度高的洗脱液合并转移至超滤管

（MWCO:10 kDa）内进行脱盐超滤，4 ℃，8 000× *g* 超滤离心，获得纯化的重组胶原蛋白。经 HPLC 检测重组胶原蛋白纯度。

1.3.7 HPLC检测重组胶原蛋白

高效液相色谱仪（SHIMADZULC-20A，检测器：SPD-20A），流动相：A 液（0.1% TFA，水溶液）量取 4.5 L 水，加入 4.5 mL 三氯乙酸，超声 2~3 min，室温保存；B 液（0.08% TFA，乙腈溶液）量取 4 L 乙腈，加入 3.2 mL 三氯乙酸，超声 2~3 min，室温保存，使用 C4 反向柱（YMC-Pack-C4，4.6×250 mm，5 μm），样品经过 0.22 μm 滤膜过滤，进样量 100 μL，梯度洗脱 30 min，流动相 B 液从 1%~99%，检测波长 220 nm。

1.3.8 胶原蛋白的分子量研究

利用 LC-MS 对重组人源化胶原蛋白纯化后的样品分子量检测，判断重组人源化胶原蛋白的实际分子量，由安徽研检检测技术有限公司检测。具体参数条件如下：流动相条件：柱温 60 ℃，上样量 5 μL，A 相：0.1%（*φ*）甲酸水，B 相：0.1%（*φ*）甲酸乙腈。质谱条件：ABTriple TOF 质谱仪进行一级质谱数据采集。一级采集范围 600~4 000，ESI 离子源参数设置如下：雾化气压（GSI）：65 Psi，辅助气压：65 Psi，气帘气压：35 Psi，温度：650 ℃，喷雾电压：5 500 V（正离子模式）。

1.3.9 数据分析

使用 GraphPad Prism 10 和 Excel 进行图形和图表的制作，并进行数据分析。蛋白电泳图像分析使用 ImageJ 软件完成。BCA 法测定蛋白浓度，标曲和样品均进行了三次重复实验保证结果的重复性和可靠性。

2 结果与讨论

2.1 工程菌的构建与鉴定

有研究显示，通过优选亲水性氨基酸区域片段，密码子优化和添加促溶标签能够提高胶原蛋白亲水性，解决其在大肠杆菌宿主中表达受限和表达量低的问题[15,16]本研究构建的 3 个重组表达载体的质粒图谱如（图 1）所示，将测序结果正确的重组载体分别转入表达宿主中，菌落 PCR 鉴定转化结果（图 2），成功获得 pET28a-COL3A1，pGEX-COL3A1，pET-SUMO-COL3A13 株工程菌。

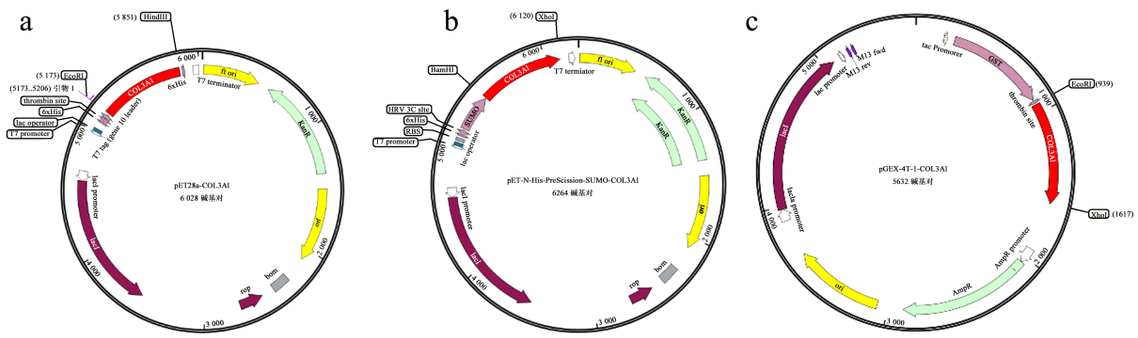


图 1 重组表达载体图谱

Fig. 1 Plasmid map of the recombinant expression vector

注：a、b、c 分别是 pET28a-COL3A1、pGEX-4T-1-COL3A1、pET-SUMO-COL3A1 重组表达载体图谱。

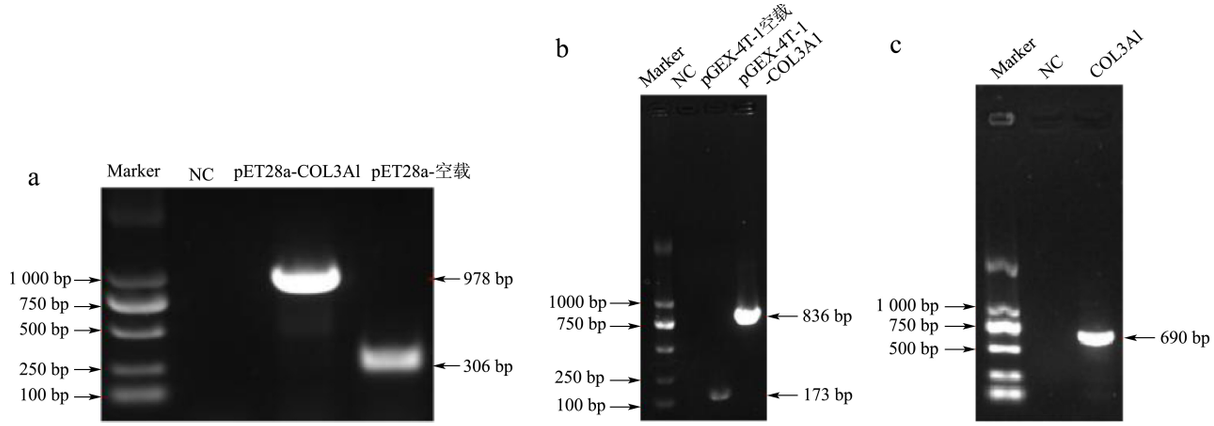


图 2 重组工程菌菌落 PCR 核酸凝胶电泳图

Fig.2 Colony PCR and agarose gel electrophoresis of the recombinant engineered strain

注：a、b、c 分别是 pET28a-COL3A1，pGEX-COL3A1，pET-SUMO-COL3A13 株工程菌菌落 PCR 核酸凝胶电泳图。

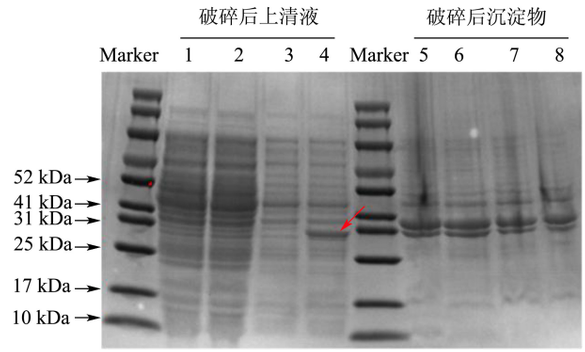


图 3 pET28a-COL3A1/BL21（DE3）诱导表达蛋白电泳

Fig.3 Electrophoresis image of the induced expression protein of the engineered bacteria pET28a-COL3A1/BL21 (DE3)

注：泳道序号 1~4 为细胞破碎后上清液，空载菌 pET28a/BL21（DE3）为对照菌：1 对照菌未诱导；2 重组菌未诱导；3 对照菌 IPTG 诱导；4 重组菌 IPTG 诱导；泳道序号 5~6 为细胞破碎后沉淀物：5 对照菌未诱导；6 重组菌未诱导；7 对照菌 IPTG 诱导；8 重组菌 IPTG 诱导。

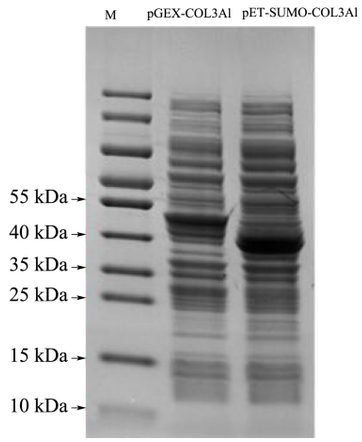


图 4 pGEX-COL3A1、pET-SUMO-COL3A1 工程菌诱导后细胞破碎上清液蛋白电泳图

Fig.4 Electrophoretic pattern of protein in the supernatant after cell lysis of pGEX-COL3A1 and pET-SUMO-COL3A1 engineered bacteria

2.2 重组人源化III型胶原蛋白摇瓶表达分析

未融合标签的 pET28a-COL3A1 工程菌株在 37 ℃条件下，诱导 4 h，表达重组人源化 III 型胶原蛋白，SDS-PAGE 蛋白电泳结果（图 3），对另外 2 株分别带有 GST 和 SUMO 标签的工程菌 pGEX-COL3A1、pET-SUMO-COL3A1 在摇瓶中，0.1 mmol·L^{-1} IPTG，37 ℃条件下诱导 4 h 后，分别取细胞破碎后上清液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳结果（图 4）。结果显示，3 株工程菌均能够可溶性表达，在诱导菌破碎后的上清液中均出现符合预期大小的明显条带，重组胶原蛋白的理论值为 20.6 kDa，6 His 标签、GST 标签和 SUMO 标签分别为 0.8、26、11.5 kDa，GST 和 SUMO 标签含亲水氨基酸占比大，且有一定的共价修饰，因此蛋白条带均比理论值偏大[17]。可溶性表达占比分别为 14.09%、19.22% 和 24.85%。经 BCA 法测定总蛋白浓度及 ImageJ 灰度值分析，三株菌的重组胶原蛋白表达量分别为 25.42、46.36 和 86.74 mg·L^{-1}。SUMO 标签能够显著促进重组胶原蛋白的可溶性表达，后续使用 pET-SUMO-COL3A1 工程菌进行 3 L 发酵罐高密度发酵。

2.3 高密度培养及蛋白表达检测

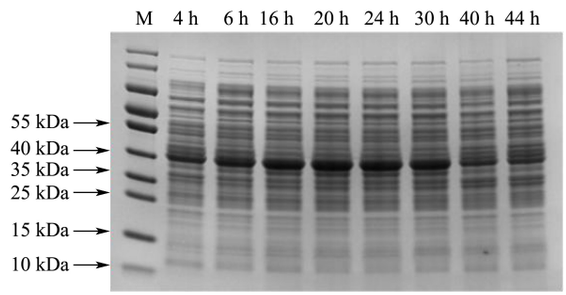


图 5 COL3A1 发酵过程中不同诱导时间 SDS-PAGE 检测结果

Fig.5 SDS-PAGE Detection results of different induction time during COL3A1 fermentation

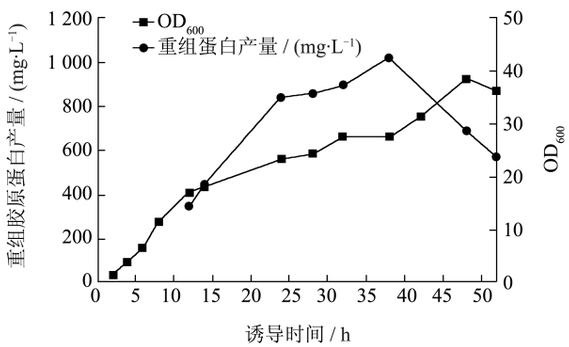


图 6 重组人源化 III 型胶原蛋白 3 L 发酵罐上补料发酵

Fig.6 Fed-batch fermentation mode for production of recombinant humanized type III collagen on a 3 L fermentor

滕飞等[18]实现了重组 I 型人源化胶原蛋白在大肠杆菌中的表达，在 5 L 发酵罐中产量最高为 1.43 g·L^{-1}。Liu 等[19]利用脯氨酰-4-羟化酶（P4H）与重组胶原蛋白基因共表达，在 5 L 发酵罐中获得产量为 0.8 g·L^{-1} 的羟基化胶原蛋白。常海燕[20]通过调整优化发酵条件，在 12.8 L 发酵罐中获得产量为 13.2 g·L^{-1} 的 II 型类人胶原蛋白，表明重组胶原的工业化生产具有很大潜力。因此为验证工程菌株的放大稳定性及蛋白表达情况，在 3 L 发酵罐中进行高密度发酵，在发酵培养基中培养 12 h 时 OD_{600} 值达到 17 此时在 30 ℃，加入

终浓度为 0.1 mmol·L^{-1} IPTG 开始诱导，此时无重组胶原蛋白表达，随着诱导时间的增加，对诱导后 4、6、16、20、24、30、40、44 h 时分别取样发酵液，测定的 OD_{600} 值也逐渐增加，在开始诱导后 30 h 时 OD_{600} 值达到最大为 38.2，之后 OD_{600} 开始下降，重组胶原蛋白的产量也开始逐渐下降。将取的样品制备上样进行蛋白检测（图 5）。计算结果显示，以上取样时间点的重组蛋白产量分别为 0.34、0.44、0.81、0.84、0.89、1.02、0.68、0.57 g·L^{-1}。工程菌在诱导后随着培养时间的增加，OD_{600} 值逐渐增加，重组胶原蛋白蛋白的产量也逐渐增加，在诱导后 30 h 时重组 III 型人源化胶原蛋白的产量最高，达到 1.02 g·L^{-1}（图 6）。

2.4 分离纯化及HPLC纯度鉴定

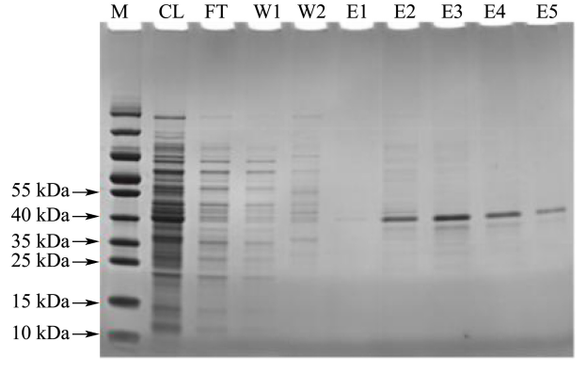


图 7 重组人源化 III 型胶原蛋白亲和层析过程检测

Fig.7 Detection of the affinity chromatography process of recombinant humanized type III collagen

注：M：marker（kDa），CL：重组菌裂解液（Cell lysate），FT：上样流穿液（flow through），W1~W2：洗涤液（wash1~2）E1~E5：洗脱液 1~5 分别含有 50、100、200、250、500 mmol·L^{-1} 的咪唑。

通过咪唑浓度梯度洗脱，确定最佳咪唑洗脱浓度，重组胶原蛋白被逐渐洗脱下来，收集每次的洗脱液制备蛋白样品，进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，检测纯化效果（图 7）。回收率测定，BCA 测定细胞均质液总蛋白质量浓度为 0.55 mg·mL^{-1}，共计上柱 130 mL 细胞均质液，上样总蛋白 71.55 mg，理论可获得重组 III 型胶原蛋白 15.08 mg，将 E1 和 E2 洗脱液收集，经超滤管超滤，BCA 测定蛋白浓度，共计获得 10.21 mg 重组蛋白，计算得到重组蛋白的回收率为 67.63%（图 8），秦红霞等[21]建立并验证了 HPLC 是一种有效检测重组胶原蛋白的方法，对获得目标蛋白进行 HPLC 检测，结果显示，重组胶原蛋白在 7.097 min 时出峰（图 9），纯度达 95% 以上。

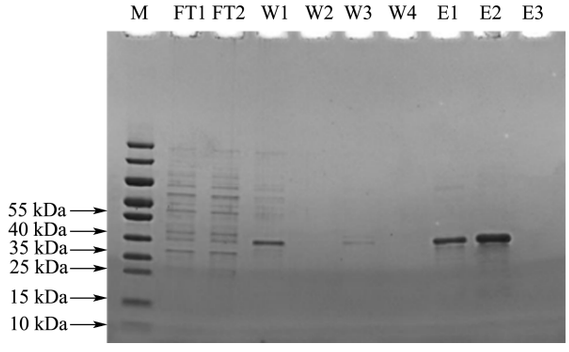


图 8 重组人源化 III 型胶原蛋白亲和层析回收率蛋白电泳

Fig.8 Protein electrophoresis of the recovery rate of recombinant humanized type III collagen protein by affinity chromatography

注：M：marker（kDa），FT1：上样流穿液 1，FT2：上样流穿液 2，W1~W4：洗涤液 1~4，E1~E3 洗脱液 1~3。

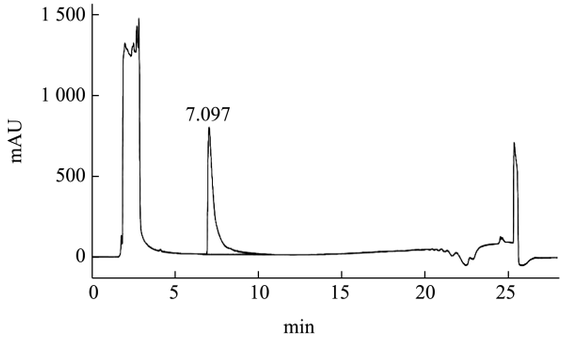


图 9 HPLC 检测重组人源化 III 型胶原蛋白纯度色谱图

Fig.9 Detection of the purity of recombinant humanized type III collagenby HPLC

2.5 分子量测定

不同类型和不同分子量的重组胶原蛋白发挥着不同的生理功能，表达的产量及难易程度也不同。胶原蛋白氨基酸序列全长重复性高、表达难度较高、易出现表达量低的情况[22,23]。准确的分子量有助于确定其市场定位[24,25]，本研究利用 LC-MS 对纯化后样品进行蛋白质精确分子量测试，鉴定其实际分子量为 31.2 kDa（图 10），这与理论分子量基本一致。推测蛋白电泳的表观分子量大于实际分子量可能与重组 III 型胶原蛋白的“Gly-X-Y”氨基酸组成、明胶分子特性有关[26]。

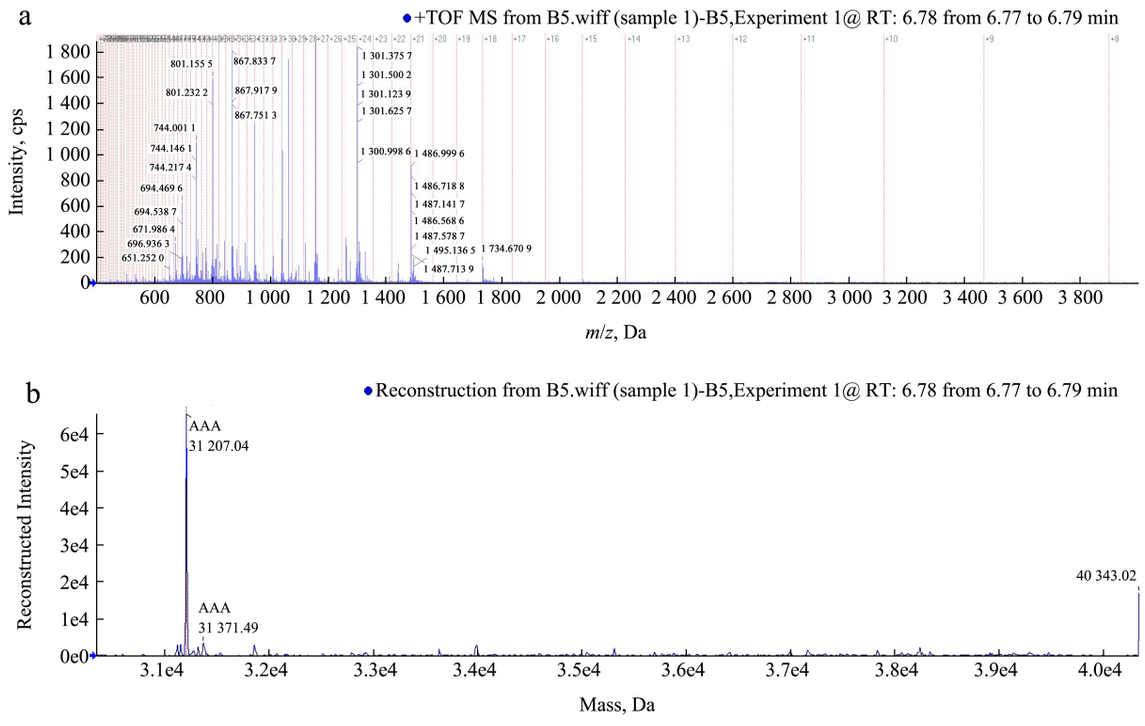


图 10 重组人源化 III 型胶原蛋白分子量 LC-MS 测定结果

Fig.10 Molecular weight of recombinant humanized type III collagen by LC-MS

注：图 a 是飞行时间质谱图（TOF MS）；图 b 是光谱重建图，丰度最高分子量为 31 207.04 Da。

3 结论

本研究成功构建了 pET28a-COL3A1/BL21（DE3）、pGEX-4T-1-COL3A1/BL21（DE3）、pET-SUMO-COL3A1/BL21（DE3）3 株工程菌，均实现了人源化 III 型胶原蛋白的可溶性表达，GST 和 SUMO 标签均能够提升重组人源化 III 型胶原蛋白的表达效率，SUMO 标签促溶效果优于 GST 促溶标签，其摇瓶产量较不含促溶标签的工程菌提高了 3.41 倍。该工程菌经 3L 发酵罐高密度培养，重组 III 型人源化胶原蛋白的表达量可达 1.02 $g \cdot L^{-1}$。在此基础上，我们建立了包括前处理、亲和层析和超滤分离在内的完整下游纯化工艺，最终获得高纯度的重组蛋白产物。质量分析显示，纯化产物经 HPLC 检测纯度≥ 95%，回收率为 67.63%，LC-MS 测定其精确分子量为 31.2 kDa。这些研究结果为重组人源化 III 型胶原蛋白的工业化生产及在化妆品，医药领域的应用提供参考。

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 Biomaterialia, 2010, 6(2): 372-382.

[2] BIRK D E, SILVER F H, TRELSTAD R L, et al. Cell biology of extracellular matrix [M]. Boston, MA: Springer, 1991.

[3] SHOSEYOV O, POSEN Y,GRYNSPAN F, et al. Human recombinant type I collagen produced in plants [J]. Tissue Engineering Part A, 2013, 19(13): 1527-1533.

[4] LEÓN-LÓPEZ A, MORALES-PEÑALOZA A, MARTÍNEZ-JUÁREZ VM, et al. Hydrolyzed collagen-sources and applications [J]. Molecules, 2019, 24(22): 4031.

[5] UITTO J. Collagen polymorphism: isolation and partial characterization of alpha 1(I)-trimer molecules in normal human skin [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1979, 192(2): 371-379.

[6] TOMAN P D, PIEPER F, SAKAI N, et al. Production of recombinant human type I procollagen homotrimer in the mammary gland of transgenic mice [J]. Transgenic Research, 1999, 8(6): 415-427.

[7] ADACHI T, TOMITA M, SHIMIZU K, et al. Generation of hybrid transgenic silkworms that express Bombyx mori prolylhydroxylase α-subunits and human collagens in posterior silk glands: Production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126(2): 205-219.

[8] STEIN H, WILENSKY M, TSAFRIR Y,et al. Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant Type-I collagen in transgenic tobacco [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(9), 2640-2645.

[9] 夏煌慧,黄建忠.重组胶原蛋白的生物合成研究进展[J].微生物

学报,2025,65(5):1939-1957.

[10] RUTSCHMANN C, BAUMANN S, CABALZAR J, et al. Recombinant expression of hydroxylated human collagen in *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(10): 4445.

[11] 刘苏.重组人源新型融合胶原蛋白的制备及活性鉴定[D].广州:华南理工大学,2022.

[12] 徐兰举,柴雪晴,刘语菲,等.重组人源Ⅲ型胶原蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化工艺[J].南开大学学报(自然科学版),2024,57(3):40-45.

[13] ZHI X X, JIN S G, JIN H S, et al. High-efciency secretory expression and characterization of the recombinant type III human-like collagen in *Pichia pastoris* [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9: 117.

[14] LI L, FAN D, MA X ,et al. High-level secretory expression and purification of unhydroxylated human collagen α1(III) chain in *Pichia pastoris* GS115 [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015, 62(4): 467-475.

[15] YUNJE C, SVETLANA G, JEFFREY P, et al. Crystalstructure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations [J]. Science, 1994, 265: 346-355.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 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.

[19] LIU S, LI Y M, WANG M, et al. Efficient coexpression of recombinant human fusion collagen with prolyl 4-hydroxylase from Bacillus anthracis in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2023, 70(2): 761-772.

[20] 常海燕.重组大肠杆菌高密度发酵生产类人胶原蛋白II工艺研究[D].西安:西北大学,2009.

[21] 秦红霞,吴倩倩.高效液相色谱法检测重组Ⅲ型人源化胶原蛋白含量[J].当代化工研究,2025,8:62-64

[22] 范代娣,段明瑞,米钰,等.重组*E.coli*工程菌高密度培养生产人源型胶原蛋白[J].化工学报,2002,53(7):752-754.

[23] XIE W J, WU Q Q, KUANG Z P, et al. Temperature-controlled expression of a recombinant human-like collagen I peptide in *Escherichia coli* [J]. Bioengineering, 2023, 10(8): 926.

[24] YUAN Y, FAN D D, SHEN S H, et al. An M2 macrophage-polarized anti-inflammatory hydrogel combined with mild heat stimulation for regulating chronic inflammation and impaired angiogenesis of diabetic wounds [J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 433: 133859.

[25] SHEN S H, FAN D D, YUAN Y, et al. An ultrasmall infinite coordination polymer nanomedicine-composited biomimetic hydrogel for programmed dressing-chemolow level laser combination therapy of burn wounds [J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 426: 130610.

[26] WERTEN M W, WISSELINK W H, JANSEN-VAN DEN BOSCH T J, et al. Secreted production of a customdesigned, highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris* [J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2001, 14(6): 447-454