外源羟脯氨酸对重组Ⅲ型胶原蛋白羟化率的提升

薛威[1]，敬丹[1]，时苗均[1]，李岩哲[1]，谢冰寒[1]，宋灿[1]，刘天琪[1]，翟征远[1,2]，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：羟基化修饰对于维持胶原蛋白三螺旋结构稳定性及生物活性具有至关重要的作用。为了使大肠杆菌表达的重组胶原蛋白羟化率达到天然水平（12%~14%），本研究利用前期构建的一株高效表达重组人源Ⅲ型胶原蛋白（rhCOL3A1，41.5 kDa）的大肠杆菌工程菌，采用外源添加羟脯氨酸（Hyp）与 $CaCl_2$ 的方法，成功制备了高羟化的 rhCOL3A1。通过调控培养基中羟脯氨酸的添加浓度（0~200 mmol·L^{-1}），可获得具有不同羟化率水平的 rhCOL3A1 产物。经纯化后，通过高效液相色谱（HPLC）分析表明，rhCOL3A1 的脯氨酸羟基化率最高可达到 63.6%，羟脯氨酸占整个蛋白氨基酸序列的 13.9%，达到天然胶原蛋白的羟基化水平。有研究表明脯氨酸羟基化能显著增强 rhCOL3A1 的结构稳定性与细胞活性，对羟化 rhCOL3A1 进行结构和功能验证，圆二色谱实验表明羟基化 rhCOL3A1 有蛋白质三螺旋结构，并表现出更强的耐胰蛋白酶降解能力。生物活性实验显示，羟化的 rhCOL3A1 细胞活性和黏附能力比未羟化 rhCOL3A1、分别提升了 23.2% 和 379.3%。本研究建立的这一技术，为重组胶原蛋白羟基化提供了新途径和理论基础。

关键词：胶原蛋白；羟基化率；羟脯氨酸；结构稳定性；细胞活性

文章编号：1673-9078(2026)10-59-66 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1718

Enhancing the Hydroxylation Rate of Recombinant Human Type III Collagen via Exogenous Hydroxyproline Supplementation

XUE Wei[1], JING Dan[1], SHI Miaojun[1], LI Yanzhe[1], XIE Binghan[1], SONG Can[1], LIU Tianqi[1], ZHAI Zhengyuan[1,2], 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: Hydroxylation modification is crucial for maintaining the structural stability and biological activity of the collagen triple helix. To achieve a hydroxylation level in recombinant collagen produced in *Escherichia coli* comparable to its natural counterpart (12%~14%), highly hydroxylated recombinant human type III collagen (rhCOL3A1, 41.5 kDa) was prepared. This was accomplished using a previously constructed engineered *E. coli* strain capable of efficient rhCOL3A1 expression, combined with a strategy involving the exogenous addition of hydroxyproline (Hyp) and $CaCl_2$. By varying the concentration of Hyp supplementation (0~200 mmol·L^{-1}) in the culture medium, rhCOL3A1 products with different hydroxylation rates were obtained. After purification, high-performance liquid chromatography analysis indicated that the proline hydroxylation rate of rhCOL3A1 could reach 63.6%, with Hyp accounting for 13.9% of the total amino acid sequence, comparable to the hydroxylation level of natural collagen. Studies have shown that proline hydroxylation significantly enhances the structural stability and cellular activity of rhCOL3A1. Structural and functional validation of the hydroxylated rhCOL3A1 was performed. Circular dichroism spectroscopy confirmed the formation of a protein triple helix, and the hydroxylated form showed markedly increased resistance to trypsin degradation. Biological activity assays revealed that the hydroxylated rhCOL3A1 showed increases of 23.2% and 379.3% in in cell viability and cell adhesion capability, respectively, compared to the non-hydroxylated form. The technique established in this study provides a novel approach

收稿日期：2025-12-01；修回日期：2026-02-28；接受日期：2026-03-03

基金项目：河南省重点研发专项（241112110500）

作者简介：薛威（1997-），男，硕士，研究实习员，研究方向：微生物、分子生物学；E-mail：xuewei23333@163.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

and theoretical foundation for the hydroxylation of recombinant collagen.

Key words: collagen; hydroxylation rate; hydroxyproline; structural stability; cell-binding activity

引文格式：

薛威,敬丹,时苗均,等.外源羟脯氨酸对重组III型胶原蛋白羟化率的提升[J].现代食品科技,2026,42(10):59-66.

XUE Wei, JING Dan, SHI Miaojun, et al. Enhancing the hydroxylation rate of recombinant human type III collagen via exogenous hydroxyproline supplementation [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 59-66.

胶原蛋白及其衍生物因其低免疫原性和优异的细胞相容性而被广泛应用于化妆品、制药和组织工程等行业[1-6]。迄今为止，人体内已鉴定出 28 种不同类型的胶原蛋白，分布于皮肤、骨骼、肌腱、软骨和血管等组织中，皮肤中 I 型和 III 型胶原蛋白含量最多，分别占到 80% 和 15% 左右[7-9]。胶原蛋白是三条同源多肽链交织在一起形成右旋、盘绕的绳状结构[10-12]。然而，胶原蛋白的功能特性高度依赖于其独特的三螺旋结构，而该结构的稳定性与功能的发挥，关键在于脯氨酸残基的羟基化修饰。这一过程由脯氨酸羟化酶催化，生成羟脯氨酸。羟脯氨酸通过形成分子间氢键，对稳定胶原蛋白的三级结构至关重要，并直接影响其生物活性[13,14]。现阶段高效表达体系如大肠杆菌、酵母等缺乏动物细胞中胶原蛋白翻译后修饰，需要引入相对应的羟化酶。而植物、杆状病毒、哺乳动物表达体系所产生胶原蛋白虽然具有完整的三螺旋结构和较好的热稳定性，但产量却远低于大肠杆菌、酵母体系且成本高昂[15-20]。为此，研究者采用了脯氨酸羟化酶与胶原蛋白共表达的方法，旨在解决上述问题。Zhu 等[21]在大肠杆菌中将 3 种羟化酶 BaP4H、DsP4H 和 L593 分别与胶原蛋白基因克隆至双启动子载体 pETduet-1 上实现同步表达，其中 L593 的羟化率最高为 17%。Liu 等[22]在大肠杆菌中将人胶原蛋白基因与炭疽芽孢杆菌脯氨酸羟化酶（BaP4H）的共表达，羟化率为 19%。在酵母底盘中，史静静等[23]在毕赤酵母中共表达了人 III型胶原蛋白 α 链和病毒来源的脯氨酸羟化酶 L593，羟化率可达 35%。

外源引入羟化酶基因虽然可以在体内实现羟基化修饰，使重组胶原蛋白接近天然的水平。但多基因共表达系统也存在一些问题，首先，技术难度远高于单基因表达且不稳定。其次催化效率也并不理想，而且强制表达多个外源基因会给细胞造成代谢负担，可能导致细胞生长缓慢，蛋白产量下降等问题[24-27]。有研究表明，羟脯氨酸可以在翻译过程中与脯氨酸共用密码子，将羟脯氨酸引入到胶原蛋白序列中[28]。NaCl 可以增加细胞对培养基中羟脯氨酸的摄取和利用效率，从而提高羟化率。张培坤[29]在大肠杆菌表达胶原蛋白过程中加入 800 mmol·L^{-1} NaCl 和 40 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸，羟化率达到 22.3%。Peng 等[30]在大肠杆菌表达胶原蛋白时加入 600 mmol·L^{-1} NaCl 和 40 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸，羟化率最高达到 66%。上述案例都是通过添加不同浓度的 NaCl 来提高羟化水平，但高浓度的 NaCl（＞200 mmol·L^{-1}）会严重抑制细胞生长活性，导致蛋白产量骤降。本研究在参考前人研究的基础上[31]，在外源添加羟脯氨酸的方法上提出用 $CaCl_2$ 替代 NaCl 的方案。实验结果显示，在 150 mmol·L^{-1} $CaCl_2$ 和 200 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸添加量下，重组胶原蛋白的羟化率可以达到 63.6%，而且对细胞生长几乎没有影响。经计算，羟脯氨酸占整个蛋白氨基酸序列的 13.9%。达到天然胶原蛋白的羟化水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

人源III型胶原蛋白表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3)-pET -SUMO-COL3A1 由实验室前期构建保存。

1.1.2 实验试剂

LB 培养基成分：胰蛋白胨，10 g；NaCl，10 g；酵母提取物，5 g；水，1 L；

H_3BO_3 缓冲液：配制 0.4 mol·L^{-1} H_3BO_3 缓冲液，用 NaOH 调节 pH 值至 10.5；

HCl 溶液：配制 6 mol·L^{-1} 的 HCl 溶液；

衍生化试剂：称取 40 mg 芴甲基氯甲酸酯（FMOC-Cl，RWAN），加入 8 mL 乙腈溶解；

标准品：配制 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 mmol·L^{-1} 4-羟基-L-脯氨酸和 L-脯氨酸标准品；

0.1%（φ）的乙酸溶液：1 mL 的乙腈溶液用蒸馏水定容至 1 L；

乙腈溶液：100% 乙腈溶液 1 L；

50 mg·mL^{-1} 硫酸卡那霉素（Kanamycin Monosulfate, Kan）溶液：准确称量 0.5 g 硫酸卡那霉素，用 10 mL 蒸馏水定容，用 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌；

2 mol·L^{-1} NaCl 溶液：称取 11.7 g NaCl 固体溶于 100 mL 水中；

2 mol·L^{-1} $CaCl_2$ 溶液：称取 29.4 g $CaCl_2$ 固体溶于

100 mL 水中；

Ni-NTA 6FF (His-Tag) 预装重力柱纯化试剂盒，购自 GE Healthcare；羟脯氨酸检测试剂盒，购自索莱宝生物科技有限公司；BeyoGel™ Plus PAGE 预制胶 (Tris-Gly，4%~20%，10 孔，P0468S)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（P0012），购自上海碧云天生物技术股份有限公司；蛋白上样缓冲液 4 X Protein SDS PAGE Loading Buffer（9173）、预染蛋白 Ladder（26616），购自 Takara；DMEM 培养基、1X PBS 缓冲液（P1020）、胰蛋白酶、CCK-8 试剂盒，购自北京索莱宝科技有限公司；异丙基 β-D-硫代半乳糖苷（IPTG，V900917），购自 Sigma 公司，考马斯亮蓝快速染液（E901），购自诺唯赞生物股份有限公司；小鼠成纤维细胞（NIH/3T3），购自无锡欣润生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

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；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；ZDZY-BS8 振荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；Chirascan V100 圆二色光谱仪，英国应用光物理公司；1220 Infinity II 高效液相，安捷伦科技有限公司；H4-20KR 高速冷冻离心机，蜀科公司。

1.2 实验方法

1.2.1 外源添加羟脯氨酸对菌株生长和活菌数的影响

大肠杆菌 BL21(DE3)-pSUMO-COL3A1 为实验前期构建的人源 III 型胶原蛋白表达工程菌株。将该菌株过夜活化，将种子液按 1% 接种于液体 LB 培养基中，37 ℃、200 r·min^{-1} 培养，待 OD_{600} 达到 0.6~0.8 之间时，加入终浓度为 0.1 mmol·L^{-1} 的 IPTG 溶液，同时分别加入终浓度为 0、50、100、150 和 200 mmol·mL^{-1} 的羟脯氨酸，以 16 ℃、200 r·min^{-1} 进行诱导表达，24 h 后测定不同处理组的 OD_{600} 和活菌数。

1.2.2 蛋白纯化及羟脯氨酸定性检测

诱导 24 h 后离心收集菌体，用 PBS 重悬后进行超声破碎蛋白，离心收集上清液。选择亲和色谱柱镍（Ni）柱进行重组蛋白的分离纯化，具体步骤为：将上清液过滤，转移至平衡好的 Ni Sepharose ™ HP 层析柱中，用 250 mmol·L^{-1} 咪唑洗脱液从柱中洗脱胶原蛋白，SDS-PAGE 蛋白电泳样品验证纯化效果。将纯化后的重组胶原蛋白质量浓度调整为 0.1 mg·mL^{-1}，用羟脯氨酸检测试剂盒测定羟脯氨酸含量。

1.2.3 添加NaCl和$CaCl_2$羟化率和蛋白表达的影响

有研究表明，外源添加 NaCl 溶液可以改变细胞膜通透性，从而进一步提高羟脯氨酸的转化率，但高浓度 NaCl 会严重抑制细胞生长，导致蛋白产量降低和溶解度下降。本研究在参考 NaCl 的基础上，尝试加入 $CaCl_2$ 溶液，验证钙盐对羟脯氨酸转化率、细胞生长和蛋白产量的影响。

配制 NaCl 和 $CaCl_2$ 溶液。实验方法同 1.2.1，在固定加入 200 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸情况下，分别加入终浓度为 50、100、150 mmol·L^{-1} 的 NaCl 和 $CaCl_2$ 溶液，对不同处理组菌株的 OD_{600} 值及活菌数进行测定。

样品处理：量取 0.5 mL 胶原蛋白溶液与 0.5 mL 6 mol·L^{-1} HCl 混合，装至具塞玻璃管，通氮气 1 min，密封，置于高温烘箱，105 ℃酸解 22 h 后，用 NaOH 调节水解液 pH 值为 7.0，取 100 μL 水解液至 1.5 mL EP 管中，加入 200 μL 0.4 mol·L^{-1} 的 H_3BO_3 缓冲液，震荡混匀，再加入 100 μL FMOC-Cl，震荡 30 s，超声处理 10 min，0.22 μm 滤膜过滤上样。用高效液相色谱法进行检测，具体检测条件如下：

色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱（4.6×150 mm，5 μm）流动相 A：乙腈，流动相 B：0.1% 乙酸；梯度洗脱：0~10 min，A 相由 40% 到 80%，10~12 min，A 相由 80% 到 98%，12~16 min，A 相维持 98%，16~19 min，A 相由 98% 到 40%，19~25 min，A 相维持 40%；PDA 检测器检测波长：262 nm；进样体积：20 μL；流量：1 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃。脯氨酸的保留时间为 10.4 min，羟脯氨酸的保留时间为 7.6 min，衍生化试剂 FMOC-Cl 的保留时间为 9.9 min。

结果计算：以脯氨酸，羟脯氨酸的标准品质量浓度为横坐标，以液相峰面积为坐标绘制标准曲线，按样品的相应的液相峰面积计算出脯氨酸、羟脯氨酸含量，并计算出羟脯氨酸在总脯氨酸中的占比。

1.2.4 胰蛋白酶耐受实验

胶原蛋白的三螺旋结构可以抑制一般蛋白酶的降解，使用胰蛋白酶消化重组人源胶原蛋白，观察重组人源胶原蛋白三螺旋结构的形成情况。

称取 2.5 mg 胰蛋白酶干粉，溶于 1 L 生理盐水，配制成 2.5 mg·L^{-1} 胰蛋白酶溶液。将重组胶原蛋白质量浓度调整为 0.1 mg·mL^{-1}，取 80 μL 不同羟化率的胶原蛋白样品，加入 10 μL 生理盐水，10 μL 2.5 mg·L^{-1} 胰蛋白酶，以未经过任何处理的胶原蛋白作为对照，30 ℃消化 1 h，取样 SDS-PAGE 分析蛋白降解结果；

通过胰蛋白酶消化实验验证不同羟化率的胶原蛋白三螺旋结构的稳定性。

1.2.5 圆二色谱结构验证

将纯化后的未羟化和羟化率 63.6% 的重组胶原蛋白样品质量浓度调整为 0.02 mg·mL^{-1}。利用 Chirascan Circular Dichroism 圆二色谱仪对制备的重组人源胶原蛋白进行扫描，扫描波长 180~260 nm 之间，光程 1 mm，波长步进为 1 nm，平均时间 0.5 s，取三次扫描平均值，其中 20 mmol·L^{-1} PBS 缓冲液作为空白对照。

1.2.6 细胞黏附和活性实验

细胞黏附实验：将未羟化和羟化胶原蛋白样品质量浓度调节至 0.4 mg·mL^{-1}。接下来，将 30 μL 胶原蛋白溶液分装到 96 孔板的各个孔中。随后，将 96 孔板在细胞培养环境中孵育 1 h。孵育后，用 DMEM 培养基调整为每毫升密度 1×10^5 个细胞，向每个孔中加入 100 μL 小鼠成纤维细胞 NIH/3T3 细胞悬液。然后，将板置于（37 ℃，5% CO_2，饱和湿度）的培养箱中 1 h 以促进细胞粘附。小心吸出培养基，每个孔用 PBS 洗涤 3 次以去除非贴壁细胞，并尽可能吸出残留液体。通过使用 CCK-8 试剂盒测量 450 nm 处的吸光度来定量细胞结合情况。

细胞活性实验：将小鼠成纤维细胞（NIH/3T3）在培养皿中达到 70% 至 80% 时，用胰蛋白酶处理成细胞密度为每毫升 5×10^4 个细胞的悬浮液。将 100 μL 细胞悬液接种到 96 孔板中的每个孔中，并在标准培养条件（37 ℃，5% CO_2，饱和湿度）下孵育 12 h。去除培养基后，使用 DMEM 培养基将样品稀释为 0.1 mg·mL^{-1}，向每个孔中加入 30 μL 并在（37 ℃，5% CO_2，饱和湿度）下孵育 48 h。然后使用 CCK-8 试剂盒在 450 nm 处测量吸光度，评估细胞活力。

1.2.7 数据分析

使用 GraphPad Prism 10 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 法测定蛋白质量浓度，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 外源添加羟脯氨酸对菌株生长和活菌数的影响

羟脯氨酸可以通过在发酵过程中利用基因结构中脯氨酸的密码子共翻译掺入的机制将羟脯氨酸引入到大肠杆菌表达的重组哺乳动物胶原序列中。外源物质可能影响菌体的生长和表达情况，因此验证外源添加不同浓度羟脯氨酸对菌株的生长和表达的影响。结果显示，不同羟脯氨酸添加量对 BL21-Psumo-COL3A1 菌株的 OD_{600} 值（图 1a）和活菌数（图 1b）无显著影响。

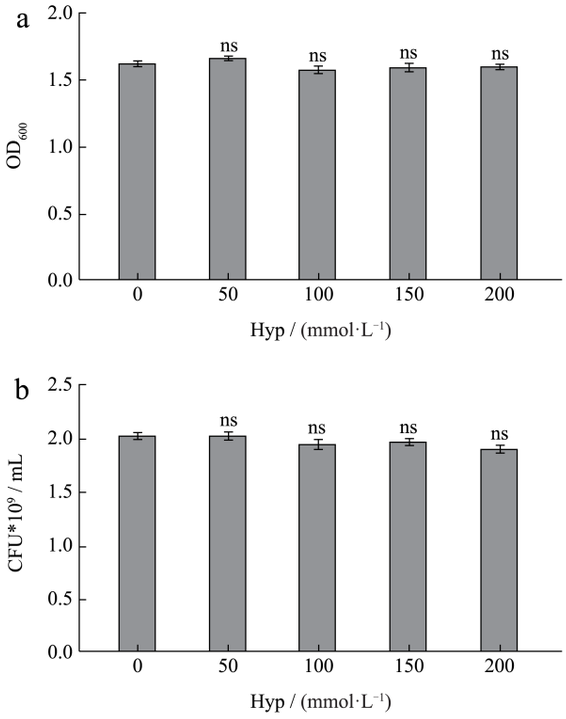


图 1 不同 Hyp 摩尔浓度添加下菌株的生长情况

Fig.1 The growth of strains under different Hyp molarity additions

注：a 图是对 OD 值的影响；b 图是对活菌数的影响。ns 表示 $P>0.05$，与对照组相比差异不显著。

2.2 蛋白纯化及羟脯氨酸定性检测

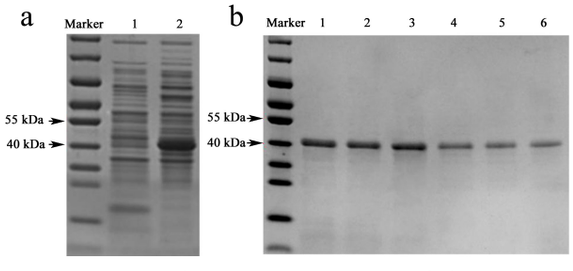


图 2 重组胶原蛋白 SDS-PAGE 蛋白电泳图

Fig.2 SDS-PAGE protein electrophoresis of recombinant collagen

注：a 图为蛋白表达结果，泳道 1 为空载菌 BL21-pSUMO 诱导后细胞破碎后上清液，泳道 2 为重组菌上清液。b 图为蛋白纯化结果，泳道 1~6 均为纯化后胶原蛋白样品。

通过 SDS-PAGE 蛋白电泳结果显示，COL3A1 的条带在 41.5kDa，蛋白表达结果正确（图 2a）。从纯化效果上来看，Image J 分析得到蛋白纯化率达到 95%（图 2b）。羟脯氨酸含量检测盒测定结果表明，随着

羟脯氨酸添加量的提高，Psumo-COL3A1 含有的羟脯氨酸含量有显著提高，当羟脯氨酸外源添加量为 200 mmol·L^{-1} 时，每毫克胶原蛋白中的羟脯氨酸含量达到 11 mg·L^{-1}（图 3）。

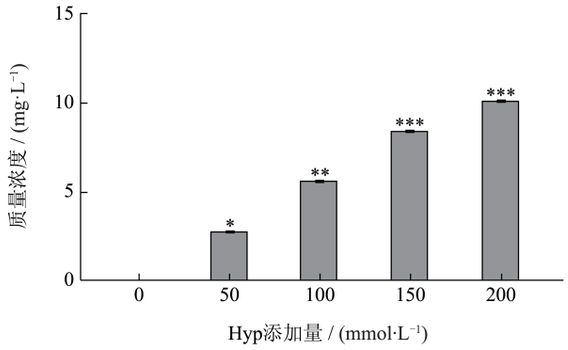


图 3 胶原蛋白中羟脯氨酸测定结果

Fig.3 The measured hydroxyproline content per milligram of collagen

注：“*”表示与对照组之间存在显著性差异，*P＜0.05，**P＜0.01，***P＜0.001。下图同。

2.3 验证添加NaCl和$CaCl_2$对细胞活性和蛋白表达的影响

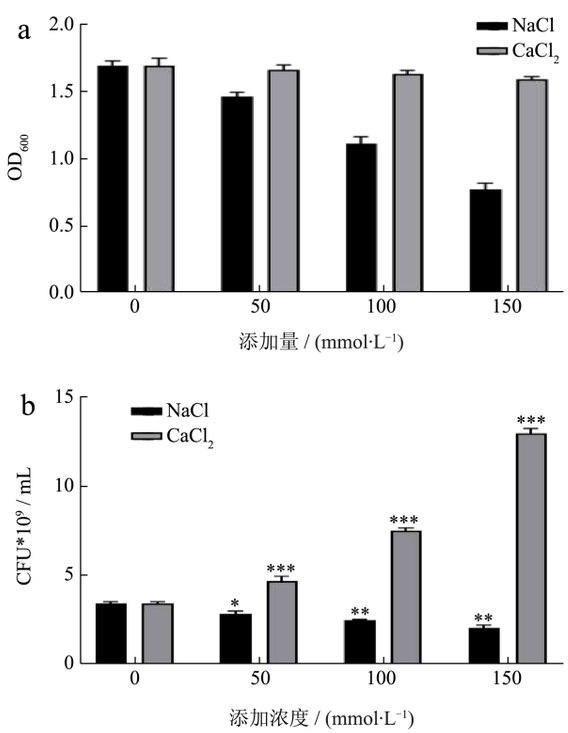


图 4 NaCl 和 $CaCl_2$ 不同摩尔浓度添加下对菌株生长的影响

Fig.4 The effect of different molarity of NaCl and $CaCl_2$ on strain growth

注：a 图是对 OD 值的影响，b 图是对活菌数的影响。

Peng 等[30]在 0~600 mmol·L^{-1} NaCl 范围内验证对羟脯氨酸掺入的影响，结果显示在大于 200 mmol·L^{-1} 时严重损害细胞生长，并未说明具体数值。有研究专利表明[31]，在发酵体系中适量添加含 Ca^{2+} 的钙盐，可以作为辅助因子，帮助维持重组大肠杆菌的细胞活性和稳定性，从而可能间接支持其生长。本研究选取的 NaCl 和 $CaCl_2$ 浓度范围在 0~150 mmol·L^{-1}。重组大肠杆菌的细胞活性增加了 23.3%。OD_{600} 值和活菌数显示，在添加不同浓度的 NaCl 后，OD_{600} 值与活菌数都出现了显著下降，而 $CaCl_2$ 的添加对 OD_{600} 值几乎没有影响，在活菌数方面，$CaCl_2$ 的添加反而有非常显著的促进作用，150 mmol·L^{-1} 添加量下活菌数是对照的 3.2 倍（图 4）。蛋白表达方面，在添加不同浓度的 NaCl 后，蛋白表达出现了显著下降，而 $CaCl_2$ 的添加几乎没有影响（图 5）。

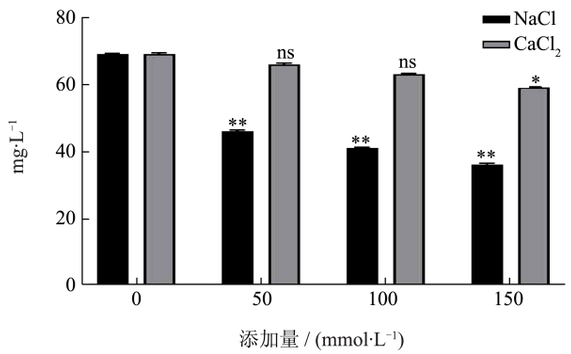


图 5 NaCl 和 $CaCl_2$ 不同摩尔浓度添加下的蛋白表达量

Fig.5 Protein expression level under different molarity of NaCl and $CaCl_2$

注：ns 表示 P＞0.05，与对照组相比差异不显著；“*”表示与对照组之间存在显著性差异，*P＜0.05，**P＜0.01。

2.4 高效液相检测脯氨酸羟化率

由定性结果可知，200 mmol·L^{-1} Hyp 添加量下的羟脯氨酸含量最高，故用高效液相测定 200 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸添加量下的胶原蛋白中脯氨酸和羟脯氨酸含量。结果显示，200 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸添加量下的重组胶原蛋白羟化率达到 32%。张培坤[29]在添加 800 mmol·L^{-1} NaCl 和 40 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸时羟化率最高达 22.3%。本研究在 100 mmol·L^{-1} NaCl 和 200 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸时羟化率达到 41.5%。添加 $CaCl_2$ 后，羟化率有明显提升，在 200 mmol·L^{-1} 羟脯氨酸 +150 mmol·L^{-1} $CaCl_2$ 添加量下羟化率最高达到了 63.6%（图 6）。换算成羟脯氨酸在总氨基酸序列中的占比为 13.9%，达到天然胶原蛋白的羟化水平（12%~14%）。

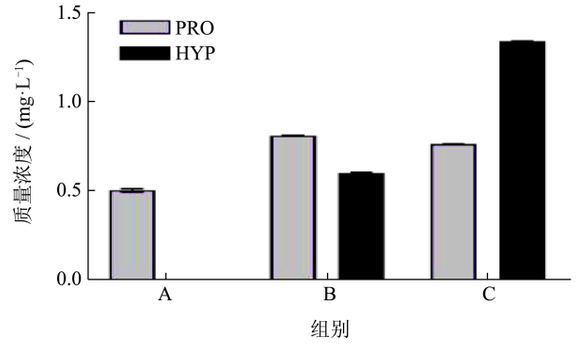


图 6 不同摩尔浓度添加下胶原蛋白中的 Pro 和 Hyp 含量

Fig.6 The content of Proline (Pro) and Hydroxyproline (Hyp) per milligram of collagen under the different molarity additions

注：A 组为空白对照，B 组添加 200 mmol·L^{-1} Hyp，C 组添加 200 mmol·L^{-1} Hyp+150 mmol·L^{-1} $CaCl_2$。

2.5 耐胰蛋白酶降解实验

胶原蛋白三螺旋结构对一般蛋白酶具有耐降解作用，Peng 等[30]对羟化胶原蛋白用 5 mg·L^{-1} 的胃蛋白酶在 4 ℃下消化 16 h，结果表明羟化胶原蛋白的三螺旋结构对蛋白酶消化具有抗性。本研究在 2.5 mg·L^{-1} 胰蛋白酶，30 ℃处理 1 h 下，对未羟化胶原蛋白及羟化胶原蛋白进行消化。未经胰蛋白酶消化的蛋白的分子量为 41.5 kDa 左右，根据图 7 中蛋白电泳条带可知，经过胰蛋白酶消化，重组胶原蛋白有不同程度的降解，在 40 kDa 分子量以下区域出现了降解的蛋白样品。其中 4 号泳道为羟化率最高的样品（63.6%），可见样品降解程度最低，其低分子量区域无明显降解条带。

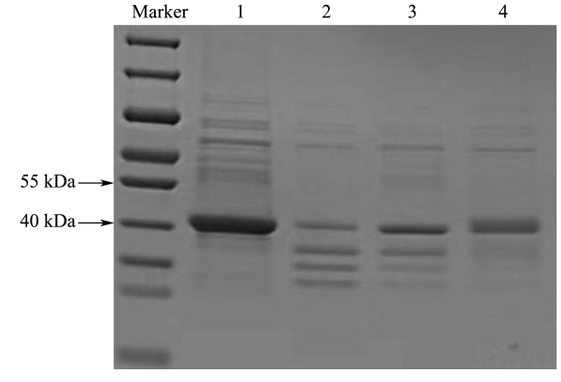


图 7 胰蛋白酶降解实验结果

Fig.7 Trypsin degradation experiment results

注：泳道 1 为对照组，2~4 泳道重组胶原蛋白羟化率分别为 0%、32.2%、63.6%。

2.6 圆二色谱结构实验

圆二色光谱法（CD）是一种常用的蛋白二级结构测定方法。为确定重组胶原蛋白是否折叠形成三螺旋结构，天然胶原蛋白的圆二色光谱（图 8）一般在小于 200 nm 处为负吸收峰、在 220~225 nm 处有一个正吸收峰[32]。使用圆二色谱仪对羟化的重组胶原蛋白进行测定，并分析二级结构。结果如图 9 所示。图谱结果表明，未羟化胶原蛋白在 195 nm 处有一个明显的负峰，在其它波长范围无明显信号，与无规则卷曲的波形相似，说明单链状态下，未羟化胶原蛋白主要以无规则卷曲的形式存在，不具有二级结构。而高羟化胶原蛋白在 225 nm 处有一个较弱的正峰，与三螺旋的典型波形一致，说明重组胶原蛋白蛋白经过折叠，形成三螺旋结构。

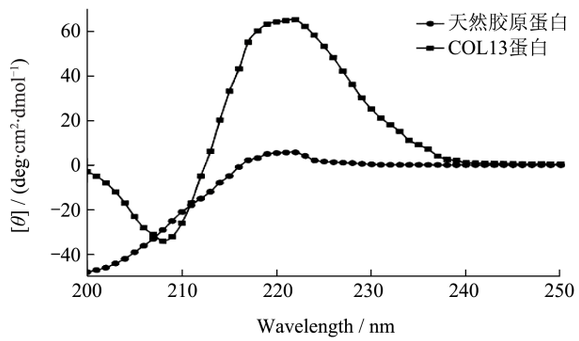


图 8 天然胶原蛋白和重组胶原蛋白的圆二色谱图

Fig.8 Circular dichroism spectra of native versus recombinant collagen

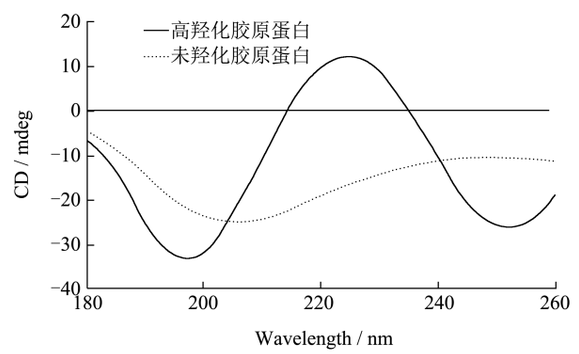


图 9 高羟化与未羟化胶原蛋白圆二色谱图

Fig.9 Circular dichroism spectra of highly-hydroxylated and non-hydroxylated collagen

2.7 细胞黏附和活性实验

胶原蛋白具有良好的生物活性，可以为细胞提供黏附支持并促进其增殖。Zhu 等[21]通过小鼠成纤维细胞和 cck8 试剂检测盒验证表明羟化胶原蛋白的细胞黏附能力和活性分别是未羟化胶原蛋白的 2 倍和 1.34 倍。本研究实验结果表明，高羟化胶原蛋白样品在细胞黏附和活性效果上表现最好。黏附实验表明，63.6% 羟化胶原蛋白效果最好，是 ck 和未羟化胶原蛋白的 5.09

倍和 3.79 倍（图 10）。活性实验分别是 ck 和未羟化胶原蛋白的 1.33 倍和 1.23 倍（图 11）。

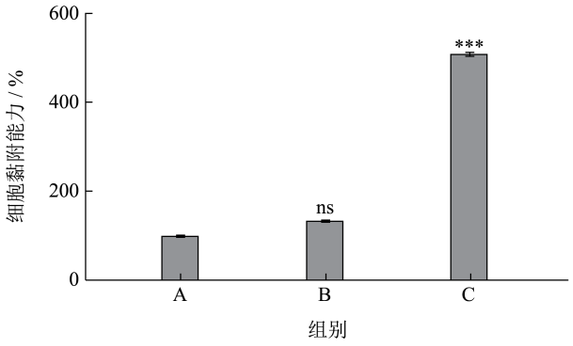


图 10 不同羟化率胶原蛋白对细胞的粘附效果

Fig.10 Cell adhesion effects of the different hydroxylated collagen

注：A 组为空白对照、B组为未羟化胶原蛋白、C 组为羟化率 63.6% 的胶原蛋白。ns 表示 $P>0.05$，与对照组相比差异不显著；“*”表示与对照组之间存在显著性差异，***$P<0.001$。

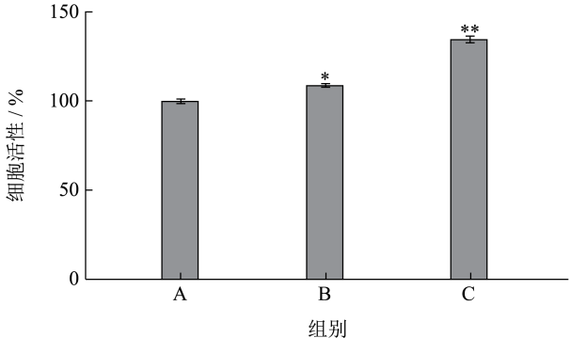


图 11 不同羟化率胶原蛋白对细胞活性的效果

Fig.11 Cell viability effects of the different hydroxylated collagen

注：A 组为空白对照、B 组为未羟化胶原蛋白、C 组为羟化率 63.6% 的胶原蛋白。“*”表示与对照组之间存在显著性差异，*$P<0.05$，**$P<0.01$。

3 结论

本研究在一株可以表达重组人Ⅲ型胶原蛋白大肠杆菌的基础上，通过外源添加羟脯氨酸和 $CaCl_2$ 的方法，制备了达到天然胶原蛋白羟化水平的重组胶原蛋白，在结构稳定性、生物学功能以及抗蛋白酶降解能力上都有显著优势，圆二色谱实验表明羟基化 rhCOL3A1 有蛋白质三螺旋结构，并表现出更强的耐胰蛋白酶降解能力。生物活性实验显示，高羟化的 rhCOL3A1 在对细胞活性上要优于未羟化的 rhCOL3A1，且生物相容性更好，能显著促进细胞增殖与黏附。相较于外源引入羟化酶基因共表达的方法，本研究方法避免了工程菌株在传代过程在质粒丢失或催化效率不稳定的情况，还可以通过控制外源羟脯氨酸的添加量可以稳定制备不同羟化率的胶原蛋白样品。相较于其他研究者用 NaCl 提升羟脯氨酸转化效率的方法，本研究创造性地提出用 $CaCl_2$ 替代的方案。该方法生产的重组胶原蛋白羟化率最高可以达到 63.6%，不仅达到天然胶原蛋白的羟化水平，而且对细胞生长与表达几乎没有影响。本研究不仅证实了 $CaCl_2$ 替代方法的高效性与生物相容性，更为重组胶原蛋白在组织修复领域的临床应用及后续新型医用组织工程材料的研发，奠定了坚实的技术基础。

参考文献

[1] AVILA-RODRÍGUEZ M I, RODRÍGUEZ-BARROSO LG, SÁNCHEZ M L, et al. Collagen: a review on its sources and potential cosmetic applications [J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2018, 17(1): 20-26.

[2] 李瑛琦,龚劲松,许正宏,等.Ⅲ型类人胶原蛋白在大肠杆菌重组表达及发酵制备[J].微生物学通报,2020,47(12):4164-4171.

[3] CAO J, WANG P, LIU Y, et al. Double crosslinked HLC-CCS hydrogel tissue engineering scaffold for skin wound healing [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 625-635.

[4] PELLÁ MCG, SILVA O A, PELLÁ M G, et al. Effect of gelatin and casein additions on starch edible biodegradable films for fruit surface coating [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125764.

[5] IRASTORZA A, ZARANDONA I, ANDONEGI M, et al. The versatility of collagen and chitosan: from food to biomedical applications [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 116: 106633.

[6] SIONKOWSKA A. Collagen blended with natural polymers: recent advances and trends [J]. Progress in Polymer Science, 2021, 122: 101452.

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

[8] RICARD-BLUM S. The collagen family [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, 3(1): a004978.

[9] J MYLLYHARJU, K I KIVIRIKKO. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms [J]. Trends in Genetics, 2004,20(1): 33-43.

[10] HUA C, ZHU Y, XU W, et al. Characterization by high- resolution crystal structure analysis of a triple-helix region of human collagen type III with potent cell adhesion activity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 508(4): 1018-1023.

[11] SHOULDERS M D, RAINES R T. Collagen structure and stability [J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78: 929-958.

[12] J K MOUW, G OU, V M WEAVER. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction [J]. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2014, 15(12): 771-785.

[13] BRODSKY B, RAMSHAW J A. Bioengineered collagens [J]. Subcellular Biochemistry, 2017, 82: 601-629.

[14] RAMSHAW J AM, WERKMEISTER J A, GLATTAUER V. Recent progress with recombinant collagens produced in *Escherichia coli* [J]. Current Opinion in Biomedical Engineering, 2019, 10: 149-155.

[15] RAMSHAW J A M, WERKMEISTER J A, DUMSDAY G J. Bioengineered collagens: emerging directions for biomedical materials [J]. Bioengineered, 2014, 5(4): 227-233.

[16] CHENG Y, LI Y, HUANG S, et al. Hybrid freeze-dried dressings composed of epidermal growth factor and recombinant human-like collagen enhance cutaneous wound healing in rats [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 742.

[17] 侯增淼,李晓颖,李敏,等.重组人源性胶原蛋白的制备及表征[J].生物工程学报,2019,35(2):319-326.

[18] XU X, GAN Q L, CLOUGH R C, et al. Hydroxylation of recombinant human collagen type I alpha 1 in transgenic maize co-expressed with a recombinant human prolyl 4-hydroxylase [J]. BMC Biotechnology, 2011, 11(1): 69.

[19] QI Q, YAO L G, LIANG Z S, et al. Production of human type II collagen using an efficient baculovirus-silkworm multigene expression system[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2016, 291(6): 2189-2198.

[20] ZENG F H. Expression of recombinant collagen Ⅳ-*α*1 in human embryonic kidney 293 cells [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2020.

[21] ZHU P, MA M, YOU T, et al. Optimizing prolyl hydroxylation for functional recombinant collagen in *Escherichia coli* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282 (Pt 5): 137400.

[22] LIU S, LI Y, 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.

[23] 史静静,高源,贺婧,等.毕赤酵母中人Ⅲ型胶原蛋白*α*链与病毒羟脯氨酸酶的共表达[J].西北大学学报(自然科学版),2017,47(2):231-236.

[24] ZHAO T X, LI M, ZHENG X, et al. Improved production of trans-4-hydroxy-l-proline by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene into recombinant *Escherichia coli* with expression of proline-4-hydroxylase [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123: 109-115.

[25] TANG Y, YANG X, HANG B, 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, 2015, 178: 1458-1470.

[26] SHI J, MA X, GAO Y, et al. Hydroxylation of human type III collagen *α* chain by recombinant coexpression with a viral prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli* [J]. The Protein Journal, 2017, 36: 322-331.

[27] ZHANG H L, ZHANG C, PEI C H, et al. Efficient production of trans-4-hydroxy-L-proline from glucose by metabolic engineering of recombinant *Escherichia coli* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 66: 400-408.

[28] CHENG Z, HONG B, LI Y, et al. Preparation and characterization of hydroxylated recombinant collagen by incorporating proline and hydroxyproline in proline-deficient *Escherichia coli* [J]. Bioengineering, 2024, 11: 975.

[29] 张培坤.人源胶原蛋白的改造与重组表达[D].福州:福州大学,2021.

[30] PENG Y Y, NEBL T, GLATTAUER V, et al. Incorporation of hydroxyproline in bacterial collagen from *Streptococcus pyogenes* [J]. Acta Biomaterialia, 2018, 80: 169-175.

[31] 江南大学.一种提高重组大肠杆菌细胞活性的方法:202210491243.4[P].2022-08-12.

[32] 刘英杰,杨素珍,王啸尘,等.大肠杆菌表达重组Ⅲ型胶原蛋白及蛋白特性研究[J].食品与发酵工业,2026,52(14):73-79.