

摘要

蛋白质是生命活动的物质基础，是构成细胞的主要有机大分子。但生命活动的执行往往不是某个单一蛋白质所能完成的，几乎所有活细胞中的生物过程都是由蛋白质的复杂相互作用介导的。因此，鉴定和分析蛋白质之间的相互作用对于确定和理解生物系统中蛋白质的功能至关重要。目前有许多技术可以获取蛋白质相互作用的信息，其中由于化学交联适用于稳定真正的相互作用和冻结瞬时或不稳定的共价键相互作用，在蛋白质间的相互作用研究中已得到广泛应用。化学交联对于单个纯化蛋白和蛋白质复合物的结构表征也有显著的优势，交联中识别的交联残基/肽段提供了精确距离，有助于确定三维结构模型。

化学交联剂的特异性是进行交联实验时要考虑的最重要的特性之一，在传统交联剂的基础上，筛选开发新的化学交联剂仍是热门研究领域，特别是针对蛋白质发生交联作用的交联剂。但化学交联剂对蛋白质间交联是否发生发生以及在使用化学交联剂后检测蛋白交联的效率，现阶段仍主要依靠 SDS-PAGE 蛋白电泳法或者质谱分析技术进行检验。SDS-PAGE 蛋白电泳法检测蛋白交联步骤较为繁琐、耗时较长，而质谱法需要的仪器设备昂贵。基于此，我们开展了本实验研究，旨在开发一种快速、简便、高通量的体外初步筛选蛋白化学交联剂的新方法。

本研究构建了带有组氨酸标签和红色荧光蛋白（mCherry）目的基因的质粒载体 pET29(b)-mCherry，以红色荧光蛋白（mCherry）和无标签的可溶性绿色荧光蛋白(soluble GFP, sGFP)为实验材料，借助组氨酸标签与固相介质（Ni NTA Beads）吸附结合特性，采用甲醛和戊二醛两种化学交联剂对两种荧光蛋白进行交联。在研究等摩尔浓度荧光蛋白混合液交联中，通过添加等量 Ni NTA Beads 吸附结合后，检测剩余溶液中 sGFP 荧光强度初步确定最佳交联剂交联浓度。通过同时开启激光共聚焦显微镜 594 nm 和 488 nm 激发波长，对 Ni NTA Bead 直观化检测，检验交联作用的发生与否，并利用 CellSens Standard 软件对显微镜捕获的结果进行交联效率的统计。为进一步验证本研究方法的灵敏性与稳定性，我们设计了微量检测非等比例荧光蛋白摩尔浓度交联。在一种荧光蛋白浓度比较微量的前提下，改变另一种荧光蛋白的加入量，观察本研究技术是否依旧可以

快速灵敏地检测到交联结果。最后，我们使用传统的 SDS-PAGE 技术辅助检测戊二醛和甲醛不同浓度对两种荧光蛋白的交联结果，进一步验证本研究技术的准确度。

实验结果表明，成功构建 pET29(b)-mCherry 质粒载体，并诱导纯化得到红色荧光 mCherry 和高可溶性绿色荧光蛋白 sGFP。最佳交联浓度实验结果表明，戊二醛的最佳交联浓度为 1.0%，甲醛最佳交联浓度为 1.5%，此时，其对应的蛋白溶液中 sGFP 荧光强度最低。激光共聚焦显微镜观察及效率统计结果显示，在同时开启 594 nm 和 488 nm 激发波长下，实验样品呈现双荧光（黄色），两种交联剂的所有实验样品均已发生交联，而对照组中仅有 mCherry 呈现红色荧光，且 1.0%戊二醛浓度的交联效率及 1.5%甲醛浓度的交联效率为同组最高，分别为 95.6%，90.9%。二种蛋白非等比例下的研究表明，即使在荧光蛋白溶液为 3 μ L 以及两者浓度差异为 27 倍时，仍能比较灵敏地检测交联效果。SDS-PAGE 结果表明，两种交联剂的样品存在特异条带，所有样品已发生交联，与上述实验结果一致。总之，本实验为体外检测蛋白化学交联剂的研究提供了一个简便、高效的直观化技术手段，同时也为体外初步大量快速筛选蛋白化学交联剂提供了技术可能性。

关键词： 荧光蛋白；化学交联剂；荧光检测；交联效率。

ABSTRACT

Proteins are the functional material basis for life, the organic macromolecules that constitute cells and the main undertakers life activities. However, the execution of life activities can't be accomplished by a single protein. Almost all biological processes in living cells are mediated by the complex interactions of proteins. Therefore, the identification and analysis of protein-protein interactions is critical to determine and understand the function of proteins in biological systems. At present, there are many techniques to obtain information of protein-protein interactions, among which chemical cross-linking has been widely used in the study of protein-protein interactions because it is applicable to stable true interactions and frozen transient or unstable covalent bond interactions. Chemical cross-linking also has significant advantages for the structural characterization of individual purified proteins and protein complexes. The identified cross-linked residues/peptides in the cross-linking provide distance constraints that help to determine three-dimensional structural models.

The specificity of chemical cross-linking agents is one of the most important characteristics to be considered in cross-linking experiments. On the basis of traditional cross-linking agents, screening and developing new chemical cross-linking agents is still a hot research field, especially for protein cross-linking agents. However, at present, protein electrophoresis of SDS-PAGE or mass spectrometry is still the main method to test whether chemical cross-linking agents can occur between proteins and the efficiency of detecting protein cross-linking after using chemical cross-linking agents. Protein electrophoresis of SDS-PAGE is a complicated and time-consuming method to detect protein cross-linking, while mass spectrometry requires expensive equipment. Therefore, we conducted this study to develop a rapid, simple and high-throughput method for preliminary screening of protein chemical cross-linking reagents in vitro.

This study constructed with histidine labels and red fluorescent protein (mCherry) gene

plasmid vector pET29(b)-mCherry, with red fluorescence protein (mCherry) and no labels of soluble green fluorescent protein (soluble GFP, sGFP) as experiment material, with the aid of histidine labels and solid medium (Ni NTA Beads) adsorption characteristics, two chemical cross-linking agents of formaldehyde and glutaraldehyde was carried out on the two kinds of fluorescent protein crosslinking. In the study of cross-linking of fluorescent protein mixture with equal molar concentration, the optimal cross-linking concentration of cross-linking agent was preliminarily determined by detecting the fluorescence intensity of sGFP in the remaining solution after adding the same amount of Ni NTA Beads. By simultaneously turning on the laser confocal microscope at 594 nm and 488 nm excitation wavelengths, the Ni NTA Bead was visually detected to check whether the cross-linking effect occurred, and the software Cellsens Standard was used. The software calculates the cross-linking efficiency of the results captured by the microscope. In order to further verify the sensitivity and stability of this method, we designed a trace detection of non-equal proportion of fluorescence protein molar concentration cross-linking. Under the premise of relatively small amount of one fluorescent protein, the addition amount of the other fluorescent protein was changed to observe whether the research technique could still detect the cross-linking results quickly and sensitively. Finally, we used the traditional SDS-PAGE technology to assist detection, and the cross-linking results of glutaraldehyde and formaldehyde at different concentrations on the two fluorescent proteins were further verified providing the accuracy of this research technology.

The experimental results showed that the pET29(b)-mCherry plasmid vector was successfully constructed, and the red fluorescent mCherry and the high soluble green fluorescent protein sGFP were induced and purified. The experimental results of optimal cross-linking concentration showed that the optimal cross-linking concentration of glutaraldehyde was 1.0%, and the optimal cross-linking concentration of formaldehyde was 1.5%. At this time, the fluorescence intensity of sGFP in the corresponding protein solution had the lowest value. Laser confocal microscope observation and statistical results show that the efficiency at the same time at the excitation wavelength of 594 nm and 488 nm, the experimental samples present dual fluorescence (yellow), two kinds of cross-linking agents of

all experimental samples have been cross-linked, and the control group containing only mCherry displayed in red fluorescence, and the concentration of 1.0% glutaraldehyde cross-linking efficiency and 1.5% formaldehyde concentration of cross-linking are highest groups, in which the efficiency are 95.6%, 90.9% respectively. The non-proportional study showed that the cross-linking effect could be detected sensitively even when the fluorescence protein solution was 3 μ L and the concentration difference between the two was 27 times. SDS-PAGE results showed that there were specific bands in the samples of the two kinds of cross-linking agents, and cross-linking occurred in all samples, which was consistent with the above experimental results. In conclusion, this study provides a simple and efficient visualization technique for the study of protein chemical cross-linking reagents in vitro, and also provides a technical possibility for the preliminary rapid screening of a large number of protein chemical cross-linking reagents in vitro.

Key words: Fluorescent protein; Chemical cross-linking reagents; Fluorescence detection; Cross-linking efficiency.

目 录

前 言.....	1
第一章 绪论.....	3
1.1 蛋白质.....	3
1.2 化学交联技术.....	5
1.3 化学交联剂.....	7
1.4 研究目的及意义.....	10
第二章 材料与方法.....	11
2.1 实验材料.....	11
2.2 实验方法.....	17
第三章 结果与分析.....	30
3.1 pET29(b)-mCherry 原核表达质粒载体的构建与鉴定.....	30
3.2 pET29(b)-mCherry 和 pET29(b)-sGFP 的原核表达与纯化鉴定.....	31
3.3 sGFP 蛋白的去标签化观察与检测.....	32
3.4 mCherry 和 sGFP 蛋白浓度检测.....	34
3.5 双分子荧光蛋白戊二醛交联结果分析.....	35
3.6 双分子荧光蛋白甲醛交联结果分析.....	42
3.7 SDS-PAGE 辅助检测结果分析.....	49
第四章 结论与展望.....	51
4.1 结论.....	51
4.2 展望.....	52
附 录.....	60
附录 1 缩略语表.....	60
附录 2 pET29(b)-sGFP 质粒图谱.....	61
附录 3 pET29(b)-mCherry 质粒图谱.....	62
致 谢.....	63
攻读学位期间发表的学术论文.....	64

前言

蛋白质是生命活动最重要的功能分子,蛋白质之间特定的相互作用构成了细胞内生物化学反应网络的重要组成部分,对蛋白质之间的互作机理研究可以加深我们对生命活动规律的认识。目前对蛋白质相互作用的研究技术主要有酵母双杂技术、荧光双分子互补技术(BiFc)、免疫共沉淀技术(Co-IP)、噬菌体展示技术、荧光能量转移技术(FRET)、pull-down技术等^[1-8]。蛋白互作反应发生在有活性的蛋白质与蛋白质、蛋白质与蛋白亚基之间,很多蛋白之间的互作反应是瞬时反应的,而且失活蛋白或错误折叠的蛋白往往会失去原有的与特定蛋白互作的能力,这是目前所有蛋白互作技术难以规避的难点。蛋白交联技术可以通过化学物质修饰蛋白质使其对特定位点或特定类型的位点具有亲和力^[9]。利用这项技术我们可以建立稳固的蛋白质相互作用复合体,来弥补上述蛋白互作技术的缺陷^[10]。

蛋白质交联是研究蛋白间作用的常用技术之一,它使用特定的化学试剂,将蛋白间或蛋白质与其他物质进行固定结合。交联过程中,共价键的形成可能伴随着消去部分基团,也可能伴随着附加部分基团^[11]。目前常用的化学交联剂分为四类。第一类,与伯胺基团反应的交联剂(如N-羟基琥珀酰亚胺),被广泛用于与蛋白质赖氨酸残基上的 α -端和 ϵ -氨基形成稳定的共价键,具有较高的反应效率^[12,13]。第二类,巯基反应交联剂,可以通过烷基化(卤乙酰基)或二硫键交换(马来酰亚胺、吡啶二硫醇)修饰目标蛋白上的巯基^[14]。第三类交联剂可将蛋白质C端羧基和天冬氨酸和谷氨酸侧链羧基团交联(如甲醛、戊二醛)^[15,16]。最后,第四类主要通过紫外光激活形成交联的光反应性交联剂(二叠氮类、芳基叠氮类),其优点在于可以通过控制光源的时间和强度来调节反应强弱^[17,18]。

针对蛋白交联剂的效果检测及效率评估,目前主要有SDS-PAGE蛋白电泳法与质谱法,SDS-PAGE蛋白电泳法检测蛋白交联效率耗时较长,而质谱法需要的仪器设备非常昂贵,这都不利于快速检测新型交联剂的交联效率,不利于新型交联剂的开发^[19,20,21]。针对此问题,本研究利用两种不同的荧光蛋白和固相介质Ni NTA Beads,采用甲醛和戊二醛两种交联剂分别进行交联反应,通过检测固相介质上双荧光呈现强弱来判断交联效果并对交联效率进行统计,以此开发一种快

速、简便、高通量的体外初步筛选化学交联剂的新方法。

第一章 绪论

1.1 蛋白质

蛋白质参与组成生物体中所有细胞和细胞内组分的重要部分,发挥着重要功能,如免疫调节,基因表达,信息传递,催化反应等活动。生命活动的执行并不是某个单一蛋白质所能完成的。事实上,几乎所有活细胞中的生物过程都是由蛋白质的复杂相互作用介导的^[22]。蛋白质间的相互作用发生构象结构功能的变化及其构建的作用网络,都影响整个生命的发育过程,所以,以蛋白质为核心的研究具有十分重要意义,也成为生命科学热门研究领域。

1.1.1 高可溶性绿色荧光蛋白

自绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)诞生研发至今,其仍是报告基因中最有效的^[23]。多年来, GFP 已在原核、真菌、酵母以及动植物细胞中成功表达,其分子量小,易于观察,非常适合作为融合蛋白的报告基因,用于活细胞内蛋白质定位。

1962年, Shimomura 等科学家首次分离得到分子量约 27 kDa 的多肽链,是从多管水母中提取获得的^[24]。GFP 序列真正被人所熟知,是 1991年 Prasher 等从维多利亚水母 (*Aequoria victoria*) 中克隆得到了 GFP 并进行报道^[25]。1994年, GFP 首次正式作为报告基因所使用^[26], 至今已在生物学各学科中达到了广泛的应用。其与蛋白质和启动子连接,被应用于古细菌到斑马鱼和老鼠的实验研究^[27], GFP 也可用于细胞标记、亚细胞器和细胞内组分的定位^[28]。相关实验结果表明, GFP 对于生物学家来说是一个非常重要的工具,极大拓宽了从分子、亚细胞成分到组织等的实时观测范围^[29], 同时还可以提供实时信息。利用 GFP 还可以实现对蛋白质活性的分析、蛋白质结构的解析以及药物的快速筛选^[30]。

最初,野生型绿色荧光蛋白(wild type GFP, wtGFP)在大肠杆菌中表达,会发生错误折叠,形成包涵体或者荧光强度降低。针对于此,研究者对 wtGFP 进行定向进化改造,获得多种荧光强度增强及较高可溶性的 GFP 突变体,用此作为蛋白质融合标签^[31,32]。但这些突变体也有共同的缺点,即与其他蛋白融合后会影影响 GFP 的折叠与荧光,因此开发折叠性能更好的 GFP 是非常迫切的^[33]。

可溶性绿色荧光蛋白(soluble GFP, sGFP)是在 wtGFP 基础上突变了 16 个氨基酸得到的, 突变位点为 S31R, Y40I, F65L, S66T, F100S, N106K, E112V, I129T, Y146F, M154T, V164A, K167T, I168V, I172V, S206T, A207V^[34]。sGFP 与增强型绿色荧光蛋白(enhanced GFP, eGFP)相比, sGFP 具有更高的荧光强度, 更好的可溶性, 其可溶性为 82.72%^[34]。

1.1.2 红色荧光蛋白

GFP 自维多利亚水母中克隆出来, 经过一系列体外突变筛选改进, 发展出各具优点、波长不等的各种荧光蛋白突变体, 这些突变体成为了生命科学研究的强有力工具, 广阔用于细胞内分子追踪及蛋白分子标记。同时它们也存在共同缺点, 发射波长集中, 一般在 440-530 nm 之间, 这个区间的发射波长激发胞内某些物质产生荧光, 导致细胞成像高背景。针对于此, 首个红色荧光蛋白 drFP583, 商品名称为 DsRed, 激发波长和发射波长为 558/583 nm, 该研究于 1990 年被报道^[35]。其优点在于: 激发发射波长增长, 降低了细胞组织内的成像背景, 可以与 GFP 系列荧光蛋白共用, 所以一经报道迅速引起广泛关注。

DsRed 也存在其自身缺点, 其在体内外形成一个桶状结构四聚体, 由 11 个 β -折叠形成, 具有发色团的 α -螺旋穿过四聚体中心。研究表明, 四聚体的形成影响融合蛋白的定位及功能, 更容易产生聚集^[36]。此外, 野生型 DsRed 成熟速度较慢, 体外需经过两个阶段才可成熟^[37]。针对这些缺点, 研究人员对 DsRed 进行了一系列的随机突变及分子改造筛选, 得到了单体荧光蛋白 mRFP1^[38]。与野生型 DsRed 相比, mRFP1 在亮度和成熟度上都有了提升, 因为其含有的一些突变位点, 参与破坏了相互作用, 从而使聚集度得到了降低, 激发波长和发射波长增长为 584/607 nm, 半成熟时间缩短为不到 1 小时。

在上述基础上, Shaner^[39]等对 mRFP1 进行突变改造, 筛选出成熟速度及激发发射波长进一步提升的突变体。再对该突变体一些氨基酸进行替换添加, 减少了荧光蛋白和融合蛋白相互影响。再次经过筛选及定向突变, 对所得到的荧光蛋白进行优化, 最终得到第二代单体红色荧光蛋白 mCherry。与 mRFP1 相比, mCherry 荧光亮度更强, 成熟时间进一步缩短(半成熟时间约 15 min), 激发波长和发射波长增长为 589/610 nm。研究表明, 无论在 N 端还是 C 端进行融合外源蛋白, 融合蛋白的功能及荧光蛋白活性相互之间并没有明显受到影响^[39]。DsRed 演化至今, mCherry 是性能最好的红色荧光蛋白之一, 研究者多和 GFP

系列荧光蛋白共同使用，达到多荧光标记的目的。

1.2 化学交联技术

蛋白质-蛋白质相互作用是细胞功能关键的决定因素，在空间和时间上起着协调功能的作用^[40,41]。因此，鉴定和分析蛋白质之间的相互作用对于确定和理解生物系统中蛋白质的功能至关重要。目前有许多技术可以获取蛋白质相互作用的信息，例如质谱分析技术（MS）^[41]、荧光双分子互补技术^[42,43]、酵母双杂交^[44]、体内荧光共振能量转移（FRET）^[45]以及免疫沉淀反应（IP）已经成为检测和表征蛋白质-蛋白质相互作用的重要工具。然而，大多数这些方法通常需要辅助系统，如对原生细胞进行基因修饰或破坏原始细胞环境，从而导致假阳性和假阴性结果^[46,47]。

为了满足蛋白质组学研究的两个主要需求，化学交联策略已经被研究了很多年：(i) 蛋白质相互作用网络的鉴定；(ii) 蛋白质和蛋白质复合体结构的低分辨率映射。化学交联技术在蛋白质间的相互作用研究中已得到广泛应用，由于其固有的潜力，这些方法适用于稳定真正的相互作用和冻结瞬时或不稳定的共价键相互作用^[48,49]。报道中，与化学交联技术紧密结合的技术，化学交联结合质谱分析的应用，其显著的优势被广泛报道^[41,50-55]。

化学交联对于单个纯化蛋白和蛋白质复合物的结构表征也有显著的优势^[50,56]，其中为识别的交联残基/肽段提供了精确空间距离，有助于确定三维结构模型。对于交联应用和蛋白质相互作用的研究，因为这两个领域的相关挑战和潜在效用差异很大，可以进一步分为两个不同的领域(图 1)。第一个是鉴定与特定目标蛋白质的相互作用。第二个是大规模测定相互作用的蛋白质。多年来，化学交联和 IP 方法、MS 方法一直被用于靶向相互作用。在交联和 IP 后的 SDS 凝胶图像中观察到较高分子量的条带，往往表明存在相互作用。为了鉴定这些相互作用，对两个或多个独特的经胰蛋白酶降解多肽的分析和鉴定通常足以鉴定蛋白质相互作用的结构域^[57,58]。交联和质谱分析方法结合的交联质谱（CXMS）过程方法与上述相似（图 2），具体过程如下：

- 1) 蛋白质交联反应，有许多不同类型的连接剂，包括稳定同位素，可以定量检测蛋白质交联反应；
- 2) 分离/分离交联；
- 3) 酶或化学试剂将蛋白质消化成多肽；
- 4) 通过理化性质富集交联肽；
- 5) 交联肽质谱检测方法优化；
- 6) 交联图谱交

叉链接点的数据处理(图 2)。

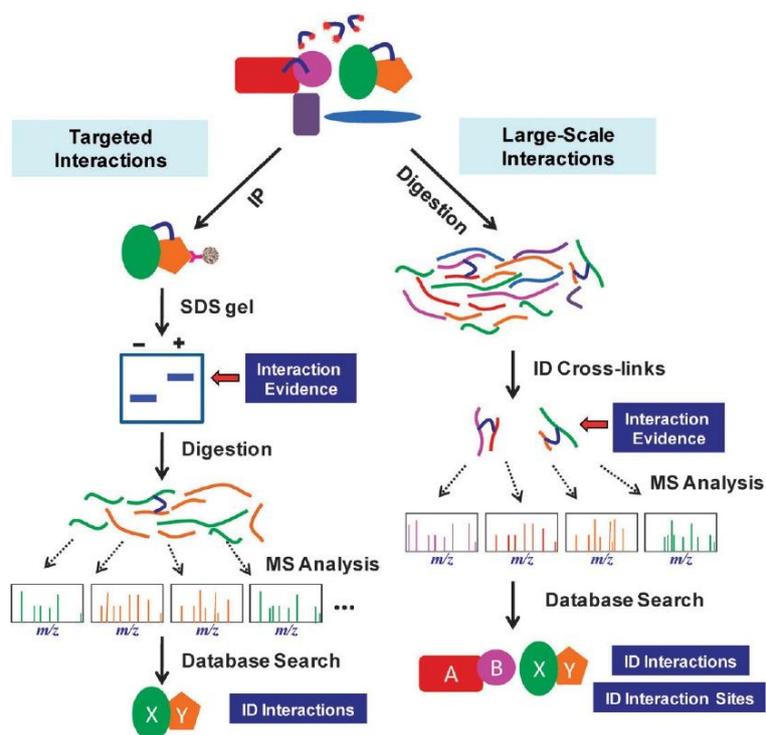


图 1 交联应用领域:目标交互和大规模交互^[50]

Fig. 1 Cross-linked application domain: Target interaction and large-scale interaction

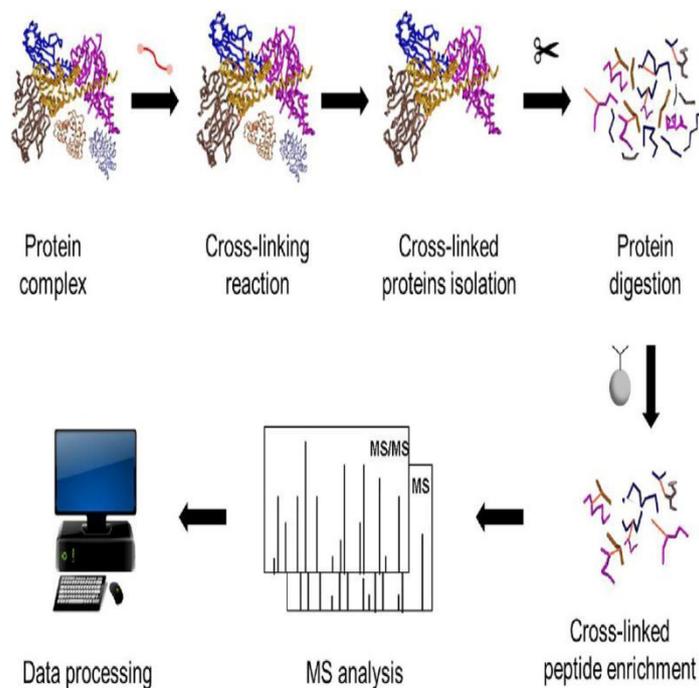


图 2 交联质谱实验工作流程示意图^[41]

Fig. 2 Schematic diagram of cross-linked mass spectrometry experiment workflow

事实上,与其他技术相比,交联方法的一个显著优势是,相互作用可以在细

胞内的共价键中稳定，或在细胞裂解之前更有可能稳定保持天然的、弱的和短暂相互作用的结构域；因此，确定的相互作用可能更具有生理学意义。这种方法对于膜蛋白相互作用是非常有用的，因为这类蛋白相互作用的有效溶解条件通常在体外不利于保存。重要的是，鉴定的交联肽不仅表明了蛋白质的相互作用，也提供了关于蛋白质如何在体内相互作用的信息。

然而，即使是纯化后的蛋白质复合物，鉴定其交联肽也并不容易，因为它们可能大量存在。一旦被确定为存在于细胞中的相互作用，就可以使用常规分子生物学技术^[59,60]，诸如共结晶的分析技术和计算方法来研究这些复合物以获得更详细的信息^[61,62]。例如，Wells 已经采用了定点突变来绘制体内特定相互作用的关键结构特征，并确定这些选定相互作用的“热点”^[63]。因此，化学交联可以被认为潜在地满足蛋白质组学研究中的两个独立且截然不同的需求：蛋白质相互作用网络鉴定和蛋白质的复杂结构测量。两者都很重要，都可提供有关生物系统的关键信息。但尽管交联技术取得了重大进展，由于数据库的复杂性和多重交联的可能性，进一步在蛋白质组内应用交联策略研究蛋白质与拓扑信息的相互作用仍具有挑战性。

1.3 化学交联剂

交联剂的定义简单来说是具有两个或更多反应基团的化学试剂，这些反应性基团由间隔基团或连接区连接。反应基团的选择取决于要交联的目标分子，为了标记蛋白质，反应端可以是胺基、巯基或光反应基团。间隔链的长度常被用作“标尺”，用来估计两个相连残基的距离，提供蛋白质或蛋白质复合物的近似拓扑信息。许多基本的、传统的交联剂（两个反应性基团和一个简单的间隔链）的结构变体都可以在市场上买到。皮尔斯生物技术（Rockford, IL）一直是这一领域的主要供应商，并提供了各种各样的交联剂和技术出版物，提供了关于交联剂选择的非常有用的总结和指导^[64,65]。

进行交联实验时，交联剂的特异性首要考虑的实验影响因素之一，因为它可能会影响交联产物多样性的水平。特异性较差的交联剂，如磺酰卤化物^[66]或非特异性光诱导芳基叠氮化合物^[67]，是低分辨率三维蛋白质结构研究的首选。对于具有较少的可能交联位点的小型或中型蛋白质的结构研究，使用不太特异的交联有

助于确定交联位点。根据交联剂的理化性质,可以通过改变实验条件(如 pH 值、蛋白质/交联剂比例或辐照时间)来控制交联特异性。交联反应基团的选择高度依赖于形成共价键的蛋白质上活性位点的可用性。目前常用的化学交联剂分为四类。第一类,与伯胺基团反应的交联剂(如 N-羟基琥珀酰亚胺),被广泛用于与蛋白质赖氨酸残基上的 α -端和 ϵ -氨基形成稳定的共价键,具有较高的反应效率^[12,13]。第二类,巯基反应交联剂,可以通过烷基化(卤乙酰基)或二硫键交换(马来酰亚胺、吡啶二硫醇)修饰目标蛋白上的巯基^[14]。第三类交联剂可将蛋白质 C 端羧基和天冬氨酸和谷氨酸侧链羧基团交联(如甲醛、戊二醛)^[15,16]。最后,第四类主要通过紫外光激活形成交联的光反应性交联剂(二叠氮类、芳基叠氮类),其优点在于可以通过控制光源的时间和强度来调节反应强弱^[17,18]。

除了交联反应基团外,还可以在交联剂的结构中加入其他特定的官能团,帮助丰富交联产物或增强质谱检测的特异性。富集过程可以通过将交联蛋白共价结合到珠子或固相载体上进行,然后通过紫外线照射或化学处理切断连接剂。亲和富集技术尤其适用于低丰度交联肽的检测。亲和标记基团^[67],如生物素、抗体、炔烃、磷酸和叠氮,可以通过层析或结合固体表面选择性地纯化交联产物。

1.3.1 甲醛

甲醛作为一种亲电分子,是最小的醛类物质,易受各种亲核生物种的化学攻击,甲醛介导的反应产物的化学复杂性在很多年前就被认识到了^[68]。最初使用氨基酸,然后使用蛋白质和其他底物,结果表明,甲醛在体外反应可以与多种官能团结合,形成一系列复杂的产物^[69,70]。自 20 世纪 40 年代以来,通过研究已知这样的产物可以包括分子内和分子间交联物种,反应条件(如 pH 值、温度)会强烈影响化学改性蛋白质的性质、产量和半衰期^[71]。在使用甲醛固定的不同应用中,使用的甲醛浓度、培养时间和其他条件的不同,会产生差异较大的化学产物^[72]。

随着对甲醛反应性的研究越来越深入,人们发现,更接近于细胞内交联组分的条件,产生在早期研究中确定的一个产物子集^[73]。使用模型肽,发现甲醛与半胱氨酸、组氨酸、赖氨酸、色氨酸和精氨酸的 N-端氨基和侧链反应^[74]。在某些情况下,反应产物受到肽序列的影响,产生分子内交联,以及 N 端与组氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、色氨酸、酪氨酸和精氨酸残基与加入反应的甘氨酸分子的连接^[79]。尽管培养时间较长(48 h),但未发现甘氨酸与肽半胱氨酸或赖氨酸残基之间的加合物。随后发现使用模型底物以及甲醛浓度和反应时间的研究与其在细

胞中使用的结果更一致，发现了一个更小的甲醛反应产物子集，涉及赖氨酸、色氨酸、半胱氨酸侧链以及肽 N 端^[73]。甲醛与细胞成分的快速反应表明细胞对甲醛具有高度的渗透性，并且具有对交联基团紧密结合的特性，使得甲醛成为在体内捕获含有特定但不稳定结合的亚基大分子复合物的良好候选物质，进一步可以用质谱等技术进行分析。

1.3.2 戊二醛

戊二醛是一种线性的 5-碳二醛，是一种透明、无色至淡稻草色、刺激性油状液体，可溶于各种比例的水和酒精以及有机溶剂。主要以酸性水溶液(pH 值 3.0-4.0)的形式存在，浓度范围为小于 2% - 70% (w/v)。戊二醛具有低成本、高反应性等优点，在中性 pH 左右与胺基团反应迅速^[75]，比其他醛更有效地生成热稳定和化学稳定的交联^[76]。事实上，对胶原与单醛(甲醛)和链长为 2-6 个碳原子的双醛(乙二醛、丙二醛、琥珀醛)的交联反应的研究表明，这一系列反应的活性在有 5 个碳原子时达到最大值，因此戊二醛是最有效的交联剂之一^[77]。

在使用交联试剂时，对其结构和机理的了解十分重要。在中性 pH 值附近，戊二醛对蛋白质的高反应性是基于蛋白质中存在几个反应残基和戊二醛在水溶液中的分子形式，导致许多不同的可能反应机制^[78]。酶固定化是戊二醛作为蛋白质交联试剂的一个很好的例子。戊二醛可以与蛋白质的几个官能团反应，如胺、硫醇、苯酚和咪唑，因为最活泼的氨基酸侧链是亲核试剂。蛋白质与载体(固体载体)或蛋白质分子(无载体)之间的交联通常意味着赖氨酸残基的 ϵ -氨基^[79]，未质子化的氨基是非常活跃的亲核试剂^[80]。大多数蛋白质含有许多赖氨酸残基，因为胺基团的极性，赖氨酸通常位于蛋白质表面。此外，赖氨酸残基通常不参与催化位点，而催化位点允许适度的交联来保持蛋白质的构象和生物活性。如前所述，戊二醛在水溶液中以多种形式存在，这些形式都可能与蛋白质中的赖氨酸残基(ϵ -氨基)发生反应。

因为反应是在接近生理 pH、离子强度和温度的缓冲水溶液中进行的，戊二醛作为一种温和的交联剂被广泛用于固定化酶。固定化可在多种条件下实现，应根据所需的具体结果来选择。蛋白质化学交联技术及其应用是多学科交叉融合技术，已被应用于蛋白质生物化学、应用生物技术、工程和医学等领域。自 20 世纪 60 年代以来，戊二醛已被用于将酶和蛋白质与纤维素材料、氨基烷基硅化玻璃、聚丙烯酰胺等载体结合起来^[81]，其被广泛应用于多个领域。

1.4 研究目的及意义

在查阅文献、实验操作进程中,我们发现化学交联剂在蛋白质研究领域的应用十分广泛,蛋白质间经交联剂交联后,使用 SDS-PAGE 技术进行检测交联效果,或者直接使用质谱法进行进一步分析,该实验操作已经成为常用技术手段。但 SDS-PAGE 蛋白电泳法检测蛋白交联效果,这一过程步骤繁琐,耗时较长,且对于蛋白质间的交联效率的鉴定,也只能进行初步估算。质谱法虽然能够进一步深入分析蛋白质间、多肽间的交联,但其需要较贵重的仪器,而且如只需要检测新型化学交联剂对蛋白质间的交联是否发生效力、交联结果的效率等问题,则基本无需使用质谱分析仪。

目前,针对交联剂的效果检测及效率评估,特别是蛋白质交联剂的效力检验,并没有找到过多的相关报道以及数据的支持。针对上述问题,本研究设计利用两种不同的荧光蛋白和固相介质 Ni NTA Beads,采用甲醛和戊二醛两种交联剂分别进行交联反应,通过检测固相介质上双荧光呈现强弱来判断交联效果,并对所检测的交联结果,进行交联效率统计,以此开发一种可以快速、简便、高通量的检测化学交联剂对蛋白质间的交联效果、准确计算交联剂的交联效率的新方法,从而促进新型化学交联剂的初步筛选、开发以及该交联剂在蛋白质研究领域中的应用。

第二章 材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株与质粒

(1) 菌株

大肠杆菌 DH5 α 用于载体构建，大肠杆菌 BL21(DE3)用于外源蛋白表达，均为本实验室保存。

(2) 质粒

pET-29(b)、pET29(b)-sGFP 以及 1305N-U6-2 \times Sap I-MG 由本实验室保存。

2.1.2 主要试剂

表 2.1-1 主要试剂

Table. 2.1-1 Main reagents

试剂名称	生产公司
DL 5000 DNA Marker	北京佳兰生物科技有限公司
DL 2000 DNA Marker	
PCR 原料	宝生物工程（大连）有限公司
卡那霉素（kanamycin）， β -巯基乙醇，四甲基乙二胺（TEMED），异丙基- β -D-硫代半乳糖苷（IPTG），Tris 碱，十二烷基硫酸钠（SDS），氯化钙（CaCl ₂ ·2H ₂ O），考马斯亮蓝 R-250	北京索莱宝（Solarbio）科技有限公司
甘氨酸	国药集团化学试剂有限公司
甲叉双丙烯酰胺，丙烯酰胺	Sigma 公司
冰乙酸，醋酸钾	天津市风船化学试剂科技有限公司
氯化钠（NaCl），丙三醇（甘油）	国药集团化学试剂有限公司
His 标签蛋白纯化试剂盒(附带吸附非变性裂解液，洗涤液，洗脱液等)	碧云天生物技术有限公司
Bradford 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天生物技术有限公司

37%甲醛溶液	西陇科学有限公司
5×SDS-PAGE Loading Buffer	碧云天生物技术有限公司
Ni NTA Beads	北京博奥龙生物科技有限公司
过硫酸铵 (AP)	郑州鼎国生物有限公司

2.1.3 主要仪器设备

表 2.1-2 仪器

Table. 2.1-2 Instruments

仪器名称	型号	生产公司
激光共聚焦显微镜	FV1200	日本奥林巴斯
杂交仪	FYY-2	Stovall Life Science
脱色摇床	TY-80A	金坛市科析仪器有限公司
电泳仪	JY300E	如意科学仪器有限公司
超纯水制备仪器	IQ 7000	上海昊森仪器设备有限公司
基因扩增仪	Applied Biosystems® 2720	赛默飞世尔科技上海有限公司
立氏压力蒸汽灭菌锅	LDZM-60KCS	上海申安医疗器械厂
超净工作台	SW-CJ-2D	苏州净化设备有限公司
恒温干燥箱	GFL-230	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司
pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
植物活体影像仪	NightSHADE LB 985	BERTHOLD TECHNOLOGIES
电子分析天平	AR2140	奥豪斯国际贸易(上海)有限公司
生化培养箱	SPX-250	中仪国科(北京)科技有限公司
高性能通用台式离心机	5810 R	赛默飞世尔科技上海有限公司
双凹载玻片	NO.7104	盐城市鑫赢医疗器材有限公司
凝胶成像系统	3500R	上海天能科技有限公司
小型垂直电泳槽	CA-9980	BIO-RAD
Bio-Tek 宝特酶标仪	EPOCH2	BioTek Instruments
超声波破碎仪	JY92-IIID	宁波新芝生物科技股份有限公司

2.1.4 PCR 引物和质粒测序

PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成；由华大基因(北京)公司对成功克隆构建的质粒进行测序。

2.1.5 培养基与主要溶液配制

2.1.5.1 LB 培养基

10 g 胰蛋白胨、10 g 氯化钠、5 g 酵母提取物，定容至 1 000 mL，pH7.0，固体培养基按照 1.5% (m/v)的比例加入琼脂粉。121℃， 1.034×10^5 Pa，20 min。

2.1.5.2 主要溶液的配制

(1) 常用化学贮存液

表 2.1-3 化学储存液

Table2.1-3 The Chemical solutions

溶液名称	配制方法
1 mol/L CaCl ₂	精密天平称量 14.7 g CaCl ₂ ·2H ₂ O，定容至 100 mL，0.22 μm 微孔过滤器过滤除菌，分装，每份 10 mL，并标记名称、浓度和日期，贮存于-20℃备用。
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	称量 EDTA 186.1 g 置于 800 mL 的去离子水中，充分搅拌，NaOH 调节 pH，溶解完全后定容至 1 000 mL，高温高压灭菌，室温保存。
1 mol/L Tris-Cl (pH 8.0)	121.1 g Tris 碱置于 800 mL 的去离子水，充分溶解后，浓 HCl 调节 pH，冷却到室温后，定容至 1 000 mL，分装后高压灭菌。
50 mg/mL 卡那霉素贮存液	500 mg 硫酸卡那霉素置 9.5 mL 去离子水中，0.22 μm 微孔过滤过滤除菌，标记名称、浓度和日期，-20℃保存。
10 mg/mL 溶菌酶贮存液	精密电子天平称取溶菌酶 50 mg 溶解至 5 mL 无菌水中，分装至 1.5 mL 的 Eppendorf 管中，标记溶液名称、浓度、时间，-20℃保存。

(2) 组氨酸标签蛋白质纯化试剂

表 2.1-4 组氨酸标签蛋白纯化相关试剂

Table 2.1-4 Reagents related to purification of His-Tag labeled proteins

溶液名称	配制方法
裂解液 (Lysis Buffer)	0.78g NaH ₂ PO ₄ 、1.754g NaCl、0.068g imidazole 定容至 200 mL 无菌水, NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 0.45 μm 滤膜过滤除菌, 4℃ 保存。
洗涤液 (Wash Buffer)	0.78g NaH ₂ PO ₄ 、1.754g NaCl、1.70g imidazole 定容至 200 mL 无菌水, NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4℃ 保存。
洗脱液 (Elution Buffer)	0.78g NaH ₂ PO ₄ 、1.754g NaCl、1.70g imidazole 定容至 200 mL 无菌水, 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4℃ 保存。

(3) 感受态细胞制备的相关溶液

表 2.1-5 制备感受态细胞相关溶液

Table 2.1-5 Preparation of competent cell related solutions

溶液名称	配制方法
0.1 mol/L CaCl ₂	取出保存的 10 mL 1 mol/L CaCl ₂ 贮存液解冻, 无菌水稀释至 100 mL, 置于冰上至 0℃。
0.2 mol/L CaCl ₂	10 mL 1 mol/L CaCl ₂ 贮存液解冻, 无菌水稀释至 50 mL, 置于冰上至 0℃。
20%(v/v)甘油	200 mL 甘油置于 1 000 mL 无菌水, 充分搅拌均匀后, 分装成小份并高压灭菌后, 标记名称、浓度和日期, 冷却后, 4℃ 备用。

(4) 小量提取质粒 DNA 的裂解缓冲液

表 2.1-6 小量制备质粒 DNA 的裂解缓冲液

Table 2.1-6 Lysis buffers for the preparation of plasmid DNA in small quantities

溶液名称	配制方法
溶液 I	50 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0)、10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 6.895×104 Pa, 高压蒸汽灭菌 15 min, 保存于 4℃。
溶液 II	0.4 mol/L NaOH 和 2% (m/v)SDS 等体积混合而成, 按照使用体积现配现用, 充分混匀。
溶液 III	5 mol/L 乙酸钾 120 mL, 冰乙酸 23 mL, 无菌水 57 mL, 混合均匀后, 棕色瓶室温保存。

(5) 琼脂糖凝胶电泳相关溶液

表 2.1-7 琼脂糖凝胶电泳相关溶液

Table 2.1-7 Agarose gel electrophoresis related solutions

溶液名称	配制方法
50× Tris-乙酸 (TAE)	242 g Tris 碱溶解于 500 mL ddH ₂ O, 57.1 mL 冰乙酸、100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)定容至 1 L, 使用时稀释为 1×TAE。
10 mg/mL 溴化乙锭(EB)	1 g 溴化乙锭溶解于 100 mL ddH ₂ O, 搅拌至无颗粒物, 棕色瓶室温保存, 注意污染标志。
6×电泳加样缓冲液	蔗糖 40 g、溴酚蓝(BPB)0.25 g、二甲苯青 FF0.25 g 定容至 100 mLddH ₂ O, 4℃保存。

(6) SDS-PAGE 电泳相关溶液

表 2.1-8 SDS-PAGE 电泳相关溶液

Table. 2.1-8 SDS-PAGE electrophoresis related solution

溶液名称	配制方法
30% (m/v)储备胶缓冲液	丙烯酰胺 29.2 g、甲叉双丙烯酰胺 0.8 g, ddH ₂ O 50 mL, 搅拌至完全溶解, 定容到 100 mL, 棕色试剂瓶中 4℃保存。
1.5 mol/L pH 8.8 Tris-Cl 分离胶缓冲液	18.17 g Tris 碱, 浓 HCl 调节 pH (约 3.5 mL), 定容至 100 mL, 避光 4℃保存。
1.0 mol/L pH 6.8 Tris-Cl 浓缩胶缓冲液	12 g Tris 碱, 浓 HCl 调节 pH (约 7.5 mL), 定容至 100 mL, 避光 4℃保存。
10% (m/v)SDS 溶液	10 g SDS, ddH ₂ O 100 mL, 完全溶解后, 室温保存。
10% (m/v)过硫酸铵(AP)溶液	用前新鲜配制, 0.1 g AP、900 mL ddH ₂ O, 完全溶解使用。
4×SDS-PAGE 上样缓冲液	200 mm Tris-HCl (pH 6.8), 8% SDS, 0.4%溴酚蓝, 40%甘油。
10×SDS-PAGE 电泳缓冲液	精密电子天平称取 144 g 甘氨酸、30.3g Tris 碱溶解至 1 L 无菌水中, 配制成为 10×Lamining 贮存液, 使用时取 100 mL 10×Lamining, 10 mL 10%SDS 溶液稀释至 1L 无菌水, 即为 1×SDS 电泳缓冲液。

考马斯亮蓝 R-250 染色液	考马斯亮蓝 R-250 0.25 g, 溶于 10 mL 冰醋酸和 45 mL 甲醇中, ddH ₂ O 45 mL, 搅拌, 过滤除去未溶解的颗粒, 室温保存。
脱色液	100 mL 冰醋酸定容至 1 L 无菌水, 室温保存备用。

2.2 实验方法

2.2.1 氯化钙法制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞

(1) 菌种活化: 取出超低温保存的大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3), 于超净台中, 迅速取出菌种置于灭菌的 Eppendorf 管中, 原菌种迅速放回 -80 $^{\circ}$ C。使用灭菌后的接种环, 划线法接种至 LB 固体平板中, 37 $^{\circ}$ C 恒温倒置过夜培养。

(2) 挑取新活化的 DH5 α 、BL21(DE3) 单菌落, 接种到 3 mL 不含抗生素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h 左右。1:100 的比例将该菌液接种到 150 mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 rpm 振荡培养, 至 OD₆₀₀=0.4~0.5。

(3) 在无菌条件下, 上述菌液分装至预冷的 50 mL 无菌离心管, 冰置 15 min, 使细胞停止生长, 下述所有步骤均需无菌操作。

(4) 提前预冷离心机, 4 $^{\circ}$ C, 5 000 rpm 离心 10 min, 回收细胞。

(5) 弃去上清液, 微离心 10 s, 吸出残留培养液。

(6) 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液轻轻悬浮细胞, 冰上静置 15 min。

(7) 重复步骤(4)和(5), 20%甘油和 0.2 mol/L CaCl₂ 等体积混合, 离心管置于冰上轻轻悬浮细胞, 每份 100 μ L 分装到预冷的 1.5 mL EP 管中, 置于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存。

2.2.2 目的片段的获取方法

构建载体 pET29(b)-mCherry, 扩增目的基因 mCherry 所合成的引物如下: 上游引物为: BamH I 酶切位点, F: 5' >TATAGGATCCGATGGTGAGCAAGGGCGAG <3', 下游引物为: Sal I 酶切位点, R: 5' >GCGCGTCGACCTGTACAGCTC GTCCAT <3'。

2.2.3 PCR 扩增反应

为获得带有 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点的 mCherry 基因片段, 构建 pET29 (b)-mCherry 载体, 以本实验室保存的质粒 1305N-U6-2×Sap I-MG 为模板, 建立以下反应体系 (表 2.2-1) 进行 PCR 反应 (表 2.2-2)。

表 2.2-1 PCR 反应体系

Table 2.2-1 PCR reaction system

试剂	使用体积
Template	0.2 μ L
Forward primer	0.2 μ L
Reverse primer	0.2 μ L
dNTP Mixture (2.5 mmol/L)	0.4 μ L
MgCl ₂ (25mmol/L)	1.2 μ L
10×LA Buffer(Free mg ²⁺)	4 μ L
LA Taq(5 U/ μ L)	0.2 μ L
ddH ₂ O	up to 40 μ L

表 2.2-2 PCR 反应程序

Table2.2-2 PCR reaction program

编号	程序名称	温度(°C)	时间	循环数
1	预变性	94	5min	1
	变性	94	30s	
2	退火	55	30s	35
	延伸	72	30s	
3	延伸	72	7min	1
4	保温	4	∞	1

2.2.4 酶切载体反应

为了将载体 pET-29b(+)以及 PCR 产物进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 以便进行接下来的克隆连接反应, 建立以下酶切体系 (40 μ L) 如表 2.2-3。

表 2.2-3 DNA 酶切反应体系

Table 2.2-3 DNA digestion reaction system

试剂	使用体积
pET-29(b) or PCR 产物	30 μL
<i>Bam</i> H I	0.5 μL
<i>Sal</i> I	0.5 μL
3.1 buffer	4 μL
ddH ₂ O	up to 40 μL

2.2.5 酶切后载体和目的片段的纯化

使用琼脂糖凝胶回收试剂盒,按照试剂盒说明书步骤进行双酶切后载体和目的片段的纯化工作。

2.2.6 连接反应

(1) 建立下表 2.2-4 中的连接反应体系 (10 μL),依次加入做好标记的 PCR 反应管中。

(2) 使用移液枪充分混匀后,室温放置反应 2-3h,或 16 $^{\circ}\text{C}$ 进行过夜连接。

表 2.2-4 连接反应体系

Table 2.2-4 Connection reaction system

试剂	使用体积
载体	10-100 ng
目的片段	载体摩尔数的 3-5 倍
T4 DNA Ligase	1 μL
10 \times Ligase Buffer	1 μL
ddH ₂ O	up to 10 μL

2.2.7 质粒的热激法转化

(1) 将构建完整的质粒和 DH5 α 感受态细胞放入冰盒中冻融 5 min,取 0.2 μL ~0.5 μL 的质粒加入到感受态细胞中,反复吹打 3-5 次。

(2) 将加入质粒后的感受态细胞放入冰盒中,冰置 30 min。

(3) 冰上放置结束后,42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 90 S,再次冰置 3 min。

(4) 于超净工作台中,向完成上述实验步骤的 Eppendorf 管中加入 700 μL LB

液体培养基, 37°C, 180 rpm, 复苏 1 h。

(5) 复苏结束后, 5000 rpm/min, 离心 3 min, 在超净工作台中倾倒上清, 剩余培养基充分重悬菌体。

(6) 涂布至含卡那霉素抗性的固体培养基上, 37°C 过夜倒置培养。

2.2.8 菌落 PCR 快速筛选与鉴定重组子

(1) 菌落 PCR 检测

a. 按照下表 2.2-5 在 PCR 反应管中建立检测体系(10 μ L), 一次实验筛选 40 个单菌落。

b. 于超净工作台中, 用无菌镊子夹起白色枪头在转化培养皿上蘸取单菌落, 在新培养皿中划一道横线, 随即将枪头置于 PCR 反应管中。

c. 将白色枪头在检测体系中反复吹打混匀, 并在新培养皿和 PCR 管上做好序号标记, 两者标记必须一致, 不能出现错误, 以便后续准确挑选正确转化子。

d. 重复步骤 b、c 直至完成本次应要筛选的样品数量。

e. 上述工作结束后, 将标好序号的划线培养皿放入 37°C 恒温培养箱倒置培养, 待其长出菌落。

f. PCR 反应实验: 按照表 2.2-6 程序设置进行 PCR 反应。

g. 依照标记的数字顺序将反应后产物进行琼脂糖凝胶电泳, 和 Marker 进行比较, 在预计 DNA 片段大小位置出现特异条带, 所对应的菌落号, 即为阳性克隆。

表 2.2-5 PCR 反应体系

Table 2.2-5 PCR reaction system

试剂	使用体积
Forward primer(20 μ mol/L)	0.1 μ L
Reverse primer(20 μ mol/L)	0.1 μ L
dNTP Mixture(2.5 μ mol/L)	0.8 μ L
MgCl ₂ (25 mmol/L)	0.6 μ L
10×Buffer(Free mg ²⁺)	1 μ L
Taq polymerase(5 U/ μ L)	0.1 μ L
ddH ₂ O	up to 10 μ L

表 2.2-6 PCR 反应程序

Table 2.2-6 PCR amplification procedure

程序标号	程序名称	温度(°C)	时间	循环数
1	预变性	94	5 min	1
	变性	94	30 s	
2	退火	55	30 s	30
	延伸	72	30 s	
3	再延伸	72	7 min	1
4	保温	4	∞	1

(2) 酶切鉴定

a. 菌落 PCR 鉴定结束后, 选择出现目的片段的单菌落进行进一步鉴定。

b. 取灭菌后的 10 mL 玻璃管, 向其加入 3 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基, 用镊子夹起白枪头蘸取划线培养基上对应的序号, 这一步一定要注意序号对应的正确性。将沾有菌落的白枪头放入玻璃管中, 37°C, 200 rpm, 过夜培养。

c. 将过夜培养的菌液提取质粒, 按照下表 2.2-7 体系, 对其进行 BamH I 和 Sal I 双酶切, 检测是否真正插入有外源片段。

d. 酶切鉴定后, 选择含有目的条带的 2 个阳性克隆, 做好名称标记送至公司测序。

表 2.2-7 重组子酶切鉴定反应体系

Table 2.2-7 Recombinant enzyme digestion to identify the reaction system

试剂	使用体积
正确序号的质粒	3 μL
<i>BamH I</i>	0.2 μL
<i>Sal I</i>	0.2 μL
3.1 buffer	1 μL
ddH ₂ O	up to 10 μL

2.2.9 质粒 DNA 的提取

(1) 在超净工作台中, 将过夜培养的菌液加入 1.5 mL Eppendorf 管中, 4°C, 5 000 rpm, 离心 5 min, 弃上清, 微离心 12 S, 吸出残余培养液。

(2) 每份菌体加入 200 μL 溶液 I, 重悬菌体, 涡旋振荡, 使菌体充分悬浮。

(3) 按照提取质粒的管数, 每管加入 400 μL 溶液 II, 轻轻翻转 5~7 次, 裂解时间不超过 5 min, 打开管盖可见丝状透明物质出现, 证明质粒 DNA 已被释放。

(4) 向管内加入 300 μL 溶液 III, 轻翻 4~6 次, 混匀溶液。

(5) 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 12 000 rpm, 离心 10 min, 吸取 700 μL 上清液移至新的 Eppendorf 管, 尽量避免吸取蛋白脂肪。

(6) 加入相同体积量的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 上下振荡数次, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 rpm 离心 10 min, 将上清液再次转移。

(7) 向上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇, 剧烈震荡混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 12 000 rpm 离心 10 min, 弃去上清液。

(8) 取 1 mL 70%乙醇洗涤质粒 DNA, 12 000 rpm 离心 5 min, 倒掉乙醇溶液。

(9) 重复步骤(8), 将 Eppendorf 管微离心 30 S, 吸出剩余乙醇, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至乙醇完全挥发。

(10) 向 Eppendorf 管侧壁加入 20 μL TE-RNaseA 缓冲液(RNaseA 终浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)溶解质粒 DNA, 做好标记, -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

2.2.10 琼脂糖凝胶电泳分析

(1) 琼脂糖凝胶的制备

每块琼脂糖凝胶的比例为: 称取 3.5g 琼脂糖, 加入 38 mL 1 \times TAE 电泳缓冲液。微波炉加热 3 min 促进融化, 解冻火力, 至溶液无色透明且无颗粒物质为止, 水流下加速冷却。加入 DNA 荧光染料 EB 母液至终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 轻轻摇晃混匀, 此时溶液成微红色, 灌入水平胶框, 根据上样体积插入样梳。室温放置 30 min 左右, 待琼脂糖凝胶自然凝结, 小心拔出样梳。

(2) 样品配制与上样电泳

取下档板, 将带有凝胶的水平胶框放入电泳槽中, 加入电泳缓冲液, 加至浸没凝胶约 2 mm。取适量 DNA 样品溶液, 按照 6:1 比例加入 6 \times Loading Buffer, 充分混匀, 上样, 180V, 电泳 20~30 min。

(3) 拍照

利用凝胶成像系统 360 nm 的紫外光下观察 DNA 条带, 是否与预计条带一致, 若一致, 将目的条带切割进行纯化。

2.2.11 pET29(b)-sGFP 和 pET29(b)-mCherry 质粒的转化

采用热激转化法，将 pET29(b)-sGFP 和 pET29(b)-mCherry 质粒转化至 BL21(DE3)中获得转化菌落，步骤同 2.2.7。

2.2.12 两种荧光蛋白的诱导表达与纯化

(1) 荧光蛋白的诱导表达

挑取过夜培养的两两种荧光蛋白的单菌落分别接种于含有卡那霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 3 mL LB 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 振荡培养 7~8 h。按 1:100 接种量分别接种于 200 mL 含卡那霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 液体培养基中，同时设置对照组，按照相同接种量分别接种于 50 mL 含卡那霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 液体培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 振荡培养，待复苏培养至 OD600 为 0.45~0.55 时，加入 IPTG 至诱导浓度为 100 μM ，在 18 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 条件下振荡过夜培养。两份 50 mL 细菌接种溶液培养 5~6 h 后，8 000 rpm/min，离心 10 min 收集菌体，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 荧光蛋白溶液的处理

a. 诱导结束后，测定培养物 OD600=1.6~1.9，将锥形瓶置于冰盒内 20 min，每个样品平均分至灭菌后的 50 mL 离心管内，5 000 rpm 离心 10 min 收集菌体，将倒出培养基后的离心管倒扣至超净工作台内的吸水纸上，至基本无培养基残留。

b. 按照每克湿菌沉淀加入 5 mL 裂解液(Lysis Buffer)的比例加入裂解液，充分重悬菌体。加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL，加入适量蛋白酶抑制剂并混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中放置 30 min。

c. 将装有荧光蛋白溶液的离心管放于装有冰块的烧杯中，进行超声波破碎，间歇时间 20 s，工作时间 40 s，220 W，每个样品超声 10 min，此时菌液已变澄清。

d. 超声破碎结束后，测定 OD600=0.13~0.19。

e. 预留出 500 μL 总蛋白后，12 000 rpm 离心 10 min，将上清移至新离心管，将沉淀用和上清等体积的 PBS (pH 7.4) 重悬。

(3) 荧光蛋白的纯化

按照 His 标签蛋白质纯化试剂盒说明书进行操作，收集获得纯化后荧光蛋白溶液。

2.2.13 两种荧光蛋白表达纯化的 SDS-PAGE 检测

(1) 安装电泳设备

将 10 cm×10 cm×1.0 mm 规格的电泳玻璃板安置于配胶装置上，向电泳玻璃板注入超纯水至顶部，静置 5 min，观察水位线是否下降。若水位线保持稳定，证明装置安装无问题，进行分离胶的配制。

(2) 分离胶的配制与注入

根据目的蛋白的分子量分别为 28.4 kDa 及 28.3 kDa，选择制备 10 mL 12% 分离胶。所有溶液加入后迅速充分混匀，向玻璃板内进行注胶，注胶过程中避免产生气泡，注胶完成后，迅速加入无菌水至顶层压实分离胶，室温放置 20~30 min 左右，待分离胶完全凝固（水层与分离胶交汇处出现明显分离），倒去上层水层。

(3) 浓缩胶的配制与注入

配制 4 mL 5% 浓缩胶，各溶液加入后，迅速上下颠倒至充分混匀，向电泳玻璃板内注入浓缩胶，加至玻璃板顶层，然后快速插入样梳。室温放置 30~40 min 至浓缩胶完全凝固，垂直角度拔掉样梳，用自来水冲去样梳孔内的残余液体与碎胶。

(4) 样品的制备及上样

在 EP 管管盖做好标记，每种荧光蛋白的未诱导样品、总蛋白、破菌后上清、破菌后沉淀和纯化后的蛋白各取 32 μ L，分别加入 5×Loading Buffer 8 μ L，反复吹打，旋涡振荡混匀 30 S，65℃煮沸 10 min，各取 18 μ L 上样至样梳孔。

(5) 电泳

加样完成后，在电泳槽中加入新配制的 Tris-Gly 电泳缓冲液，电泳缓冲液加至没过电泳槽底部金属丝。120 V，电泳 1.5 h 左右，待溴酚蓝全部电泳出凝胶时，基本可以停止电泳。

(6) 凝胶染色和脱色

电泳结束后，剥胶，向容器中加入考马斯亮蓝 R-250 染色液至没过凝胶，微波炉加热至皿底微烫手，然后置于水平脱色摇床上染色 10~15 min。染色结束后，蒸馏水清洗 3 次，倒入脱色液，将容器置于微波炉中设置中高火进行加热至脱色液沸腾，然后置于水平摇床中进行脱色，按照 30 min、60 min、120 min 时间更换脱色液，或脱色两次后，加入常温脱色液过夜脱色，次日观察结果。染色和脱色过程中振荡转速为 40 rpm。

2.2.14 sGFP 蛋白的去标签化

(1) 取破碎离心后的 sGFP 上清溶液, 按照 4 mL 上清加入 1 mL Ni NTA Beads 的比例, 向破碎离心后的 sGFP 上清溶液中加入 Beads, 放入杂交仪中旋转孵育 1 h, 待两者充分孵育结合后, 拍照留存 (图 3.3-1), 平均分装至 EP 管内, 离心收集 Beads。使用洗涤液对 Beads 进行反复混匀洗涤 5~8 次, 每管加入 1 mL PBS (pH 7.4) 重悬 Beads, 取出 10 μ L 4 $^{\circ}$ C 暂存, 以待下一步检测。每 1 mL sGFP 蛋白溶液中加入凝血酶 (thrombin, 母液 200 U) 至工作浓度为 4 U/mL, 放入杂交仪中旋转孵育, 设置温度 37 $^{\circ}$ C, 过夜酶切 (大约 12 h~16 h), 以充分去除 sGFP 蛋白所携带的组氨酸标签 (图 3.3-1)。

(2) 对经凝血酶切割后的 sGFP 离心, 5 000 rpm/min, 10min, 收集 10 μ L sGFP 切割后的 Beads, 与切割前的 Beads 样品, 置于激光共聚焦显微镜下对比观察 (图 3.3-2), 以进一步检验 sGFP 去标签化的结果。

2.2.15 绘制 BSA 蛋白标准曲线

(1) 按照说明书操作, 配制牛血清白(BSA)标准品浓度分别为 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 mg/mL。制作过程中, 注意每次充分混匀, 稀释时使用 PBS (pH 7.4) 作为溶液稀释液。

(2) 各取 5 μ L 稀释好的不同浓度蛋白标准加入到 96 孔板中, 取相同体积纯化去标签后的 sGFP 蛋白溶液与纯化后 mCherry 蛋白溶液加到 96 孔板中。各孔加入 250 μ L 考马斯亮蓝 G-250 (该染色液 4 $^{\circ}$ C 保存, 待温度升至室温时再加入)。加入染色液后, 静置 10 min, 再去检测。

(3) 运用酶标仪测定各孔吸收值, 设定波长为 595 nm。同时测定纯化去标签的 sGFP 以及纯化后 mCherry 的吸光值。以 BSA 浓度为横坐标, 以各孔吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线 (图 3.4-1、3.4-2)。从而得到每次实验时, 两种荧光蛋白的准确浓度。

2.2.16 等比例双分子荧光蛋白的戊二醛交联及最佳交联浓度检测

(1) 戊二醛交联等比例双分子荧光蛋白

a. 取出灭菌后的 Eppendorf 管置于 EP 管架上, 按照等摩尔浓度比例, 向每个 Eppendorf 管中加入 sGFP 蛋白溶液 47 μ L, mCherry 蛋白溶液 33 μ L, 共计总体积为 80 μ L, 混合 6 管, 一次做平行实验组 3 组。使用母液浓度为 3% 的戊二醛溶液, 至交联终浓度为 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%, 最后一组 (对照组)

不加入戊二醛交联剂。在 Eppendorf 管管盖上按照 A-0.1%、A-0.5%、A-1.0%、A-1.5%、A-2.0%、B-0.1%、B-0.5%、B-1.0%、B-1.5%、B-2.0%、C-0.1%、C-0.5%、C-1.0%、C-1.5%、C-2.0%以及对照组做好标记，将所有样品置于 37℃恒温培养箱，交联 30 min。

b. 取出相同数量的灭菌后的 Eppendorf 管，按照上述标记序号进行标记，然后在精密电子天平上称取每一个 Eppendorf 管空管重量，并进行记录。冰箱内取出 Ni NTA Beads，通过移液枪反复吹打均匀充分混合 Beads，然后吸取 30 μL 移至做好标记的 Eppendorf 管。将所有装有 30 μL Ni NTA Beads 的 Eppendorf 管，5 000 rpm，离心 30 S,将上层吸取贮存液体，将装有 Ni NTA Beads 的 Eppendorf 管再次分别称重，确保每个 Eppendorf 管之间质量之差不超过 0.001 mg，以确保每个 Eppendorf 管中所加入的 Ni NTA Beads 的量相同。

c. 37℃交联结束后，将所有样品微离心 12 S 左右，使用移液枪将交联后样品液体分别对应转移至装有 30 μL Ni NTA Beads 的 Eppendorf 管中，一定注意不能出现标记对应错误。微弹 Eppendorf 管管底，使交联溶液与 Ni NTA Beads 混合，将所有样品转移至杂交仪中，最大转速旋转孵育 30 min。

d. 再次准备相同数量灭菌后做好标记的 Eppendorf 管，样品与 Beads 旋转孵育结束后，将所有样品进行离心，5 000 rpm、3 min，将上层交联后的样品最大程度吸取出来，转移至新准备的 Eppendorf 管中，尽量不要吸到 Ni NTA Beads。离心后管底部的 Ni NTA Beads 加入 30 μL PBS (pH 7.4) 重悬，4℃暂时保存。若转移交联液体时不慎吸取得到 Beads，要对该 Eppendorf 管再次离心。准备就绪后，开始下一步荧光强度检测。

(2) 戊二醛最佳交联浓度检测

取出 96 孔板，做好 A.B.C 三组实验组序号标记，吸取每个交联结束后的溶液 100 μL ，移至对应序号的 96 孔板中，其中交联溶液不足 100 μL 的，加入 1%NaCl 补齐体积至 100 μL 。将 96 孔板放置植物影像仪内，将植物影像仪参数设置为 exposure time: 1s, Read: Low, Gain: High，检测戊二醛交联样品溶液中，经过与 Ni NTA Beads 孵育结合后溶液中含有的 sGFP 的荧光强度（图 3.5-1）。用 Indigo 软件(2.0.5.0 版)对采集的结果图片中显示的均匀大小的区域进行平均荧光强度计算，并制作平均荧光强度曲线，以初步确定最佳交联浓度（图 3.5-1）。

2.2.17 等比例双分子蛋白戊二醛交联荧光直观化检测及效率统计

(1) 荧光直观化检测交联效果

严格按照开机顺序，将激光共聚焦显微镜进行开启以及开启软件 FV10-ASW，开关机顺序以及共聚焦显微镜的使用详见激光共聚焦显微镜提供的使用说明书。使用擦镜纸将载玻片或者双凹载玻片擦拭干净，尽量使载玻片或者双凹载玻片上彻底干净无污物。使用移液枪悬浮每一样品中的 Beads，取出 5 μL Beads 置于载玻片上，明场下找到 Beads 最佳观察视野。使用 FV10-ASW 的 Alexa Fluor 488 nm 和 Alexa Fluor 594 nm，参数设置为探测器灵敏度调节 (HV) 420 V，激光器 Laser 透过率 (Gain) 5 \times ，降噪调整 offset 为 50%，其余参数默认激光共聚焦出厂设置，同时打开两种激发波长，点击 XY Repeat 对样品中的 Beads 进行扫描观察检测。首先进行对照组的观察检测 (图 3.5-2)，再对实验组一一进行观察检测，保存双荧光激发视野图像 (图 3.5-3)。在此直观化检测过程中，需注意要保持 Ni NTA Beads 的湿润，不能使其干燥，若 PBS 蒸发，随即增添使其一直保持湿润状态，否则会大大影响观察结果。

(2) 戊二醛交联等比例双分子荧光蛋白的效率检测统计

利用 cellsens standard 软件，对激光共聚焦荧光显微镜下拍摄的戊二醛交联后 Beads，在双荧光激发视野下的结果图像进行数目统计，包括图像中含有的 Ni NTA Beads 的总数目及呈现双荧光即呈现黄色的 Beads 的个数，使用呈现双荧光 Beads 的个数占视野下 Beads 总数目的占比作为衡量交联效率的指标，对拍摄得到的每一组交联结果进行统计计算。每一结果重复统计 3 次，四舍五入保留整数，将统计结果绘制表格并制作统计柱状图显示不同戊二醛交联浓度下的交联效率 (图 3.5-3、表 3.5-1)。

2.2.18 微量检测戊二醛交联非等比例双分子荧光蛋白及交联结果统计

(1) 微量检测定量 sGFP 与不同浓度 mCherry 的戊二醛交联

a. 测定两种荧光蛋白溶液浓度后，取 sGFP 蛋白溶液 1 μL 加入 2 mL Eppendorf 管 (即圆底 Eppendorf 管)，分别按照 1:3、1:9、1:15、1:21、1:27 的摩尔比例加入 2 μL 、6 μL 、10 μL 、15 μL 、18 μL mCherry 蛋白溶液，以 3% 戊二醛溶液为母液，至戊二醛交联工作浓度为 1.0%，37 $^{\circ}\text{C}$ 、交联 30min。

b. 参照 2.3.15 (1) b 的步骤，每管准备 20 μL Beads，交联结束后，将交联后的样品与 20 μL Beads 置于杂交仪，最大旋转速度，旋转孵育 30 min。

c. 使用激光共聚焦显微镜直观化检测交联结果，参数设置同 2.3.16 (1)。观察不同比例荧光蛋白样品在戊二醛交联剂交联作用下的结果，图像同时保存绿色荧光视野、红色荧光视野、双荧光激发视野图像，并将结果图像输出为 JPG 格式，以供接下来的实验研究。

d. 以结果图像中呈现双荧光（黄色）的 Beads 数目占 Beads 总数目的比例，作为衡量交联效率的参数，使用 cellsens standard 软件，对本次实验结果进行数据统计分析。每一结果，自动统计 3 次，取其平均值制作微量检测定量 sGFP 与不同浓度 mCherry 的戊二醛交联结果数据统计表及柱状图（图 3.5-4、表 3.5-2）。

(2) 微量检测定量 mCherry 与不同浓度 sGFP 的戊二醛交联

a. 取 mCherry 蛋白溶液 1 μL ，按照 1:3、1:9、1:15、1:21、1:27 的摩尔比例加入 4 μL 、13 μL 、21 μL 、30 μL 、39 μL sGFP 荧光蛋白溶液，以 3%戊二醛溶液为母液，至戊二醛交联工作浓度为 1.0%，37 $^{\circ}\text{C}$ 、交联 30min。

b. 剩余步骤与上述实验技术路线相同，最后制作微量检测定量 mCherry 与不同浓度 sGFP 的戊二醛交联结果数据统计表及柱状图（图 3.5-5、表 3.5-3）。

2.2.19 等比例双分子荧光蛋白的甲醛交联及最佳交联浓度检测

(1) 甲醛交联等比例双分子荧光蛋白

经 Bradford 法测得 sGFP 和 mCherry 蛋白溶液浓度，按照等摩尔浓度比例，分别向 Eppendorf 管中加入 sGFP 蛋白溶液 40 μL ，mCherry 蛋白溶液 40 μL ，共计总体积为 80 μL ，混合 7 管，同时设置平行实验组共 3 组。使用母液浓度为 37%的甲醛溶液，至交联终浓度为 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%，最后一组（对照组）不加入甲醛交联剂。在 Eppendorf 管管盖上及对照组做好标记，所有样品室温交联 30 min。余下该方法技术路线参照 2.3.15 (1) 步骤，制备得到甲醛交联剂交联等比例 sGFP 和 mCherry 样品，进行甲醛最佳交联浓度的检测。

(2) 甲醛最佳交联浓度检测

取出 96 孔板，做好实验组序号标记，吸取每个交联结束后的溶液 60 μL ，移至对应序号的 96 孔板中。使用植物影像仪，参数设置同 2.3.15 (2)，检测甲醛交联样品溶液中，经过与 Ni NTA Beads 孵育结合后溶液中含有的 sGFP 的荧光强度（图 3.6-1）。用 Indigo 软件(2.0.5.0 版)对采集的结果进行平均荧光强度计算，制作平均荧光强度曲线（图 3.6-1），以初步确定最佳交联浓度。

2.2.20 等比例双分子蛋白甲醛交联荧光直观化检测及效率统计

该荧光直观化检测步骤与交联效率统计方法，参照 2.3.16 路线流程，最终得到实验结果（图 3.6-2、表 3.6-1）。

2.2.21 微量检测甲醛交联非等比例双分子荧光蛋白及交联结果统计

（1）测定两种荧光蛋白溶液浓度后，取一种荧光蛋白溶液 1 μL 加入圆底 Eppendorf 管，分别按照 1:3、1:9、1:15、1:21、1:27 的摩尔比例加入 3 μL 、9 μL 、15 μL 、21 μL 、27 μL 另一种荧光蛋白溶液，以 37% 戊二醛溶液为母液，至甲醛交联工作浓度为 1.5%，充分混匀后，室温静置交联 30min。

（2）后续实验技术路线同 2.3.17 实验步骤，收集整理实验数据，得到实验结果（图 3.6-3、3.6-4 及表 3.6-2、3.6-3）。

2.2.22 SDS-PAGE 辅助检测交联效果

（1）戊二醛交联：等摩尔浓度混合 sGFP 和 mCherry 蛋白溶液，使用母液浓度为 3% 的戊二醛溶液，至交联终浓度为 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%，设置对照组不加入戊二醛交联剂。37 $^{\circ}\text{C}$ 、交联 30 min。

（2）甲醛交联：等摩尔浓度混合 sGFP 和 mCherry 蛋白溶液，使用母液浓度为 37% 的甲醛溶液，至交联终浓度为 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%，设置对照组不加入甲醛交联剂，室温交联 30 min。

（3）SDS-PAGE 的具体实验流程及上样样品的制备步骤，同 2.2.12 步骤，最终得到实验结果（图 3.7）。

第三章 结果与分析

3.1 pET29(b)-mCherry 原核表达质粒载体的构建与鉴定

以 1305N-U6-2×Sap I-MG 质粒为模板, PCR 扩增获得带有 *Bam*H I、*Sal* I 的酶切位点的目的基因 mCherry, 片段长度为 715 bp, 与目标条带大小一致(图 3.1 A)。将 mCherry 片段克隆到 pET-29b(+)质粒中, 经转化, 进行菌落 PCR, 结果显示存在阳性克隆(图 3.1 B)。菌落 PCR 后, 选取阳性克隆摇菌提取质粒, 以未插入目的片段的原质粒作为对照, 用 *Bam*H I和 *Sal* I双酶切进行鉴定, 得到 717 bp 目的基因片段 mCherry(图 3.1 C)。双酶切成功的质粒, 送至公司测序, pET29(b)-mCherry 经测序验证正确。

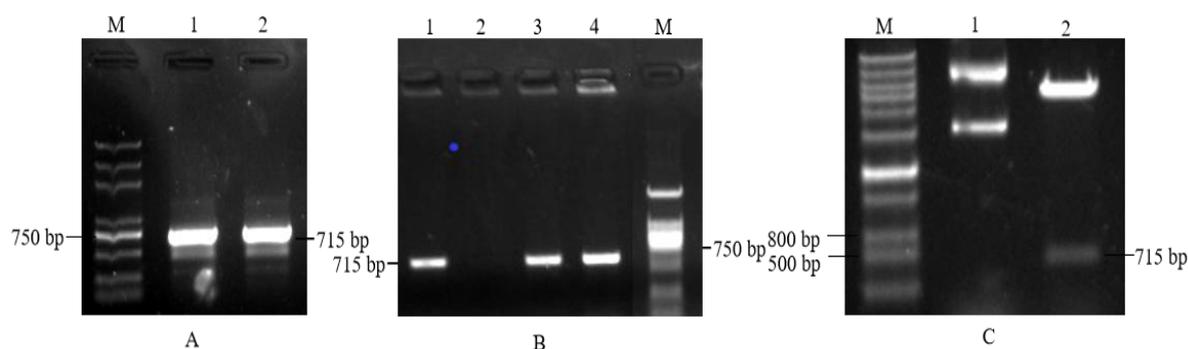


图 3.1.原核表达质粒载体的构建与鉴定

Figure 3.1. Construction and identification of prokaryotic expression plasmid vectors

注: ABC 图中, A. PCR 扩增片段 mCherry (1~2. PCR 扩增片段 mCherry); B. 菌落 PCR 鉴定 pET29(b)-mCherry (2. 阴性克隆; 1、3、4. 阳性克隆); C. pET29(b)-mCherry 重组质粒酶鉴定(1. pET29-b(+)空载体对照;2. *Sal* I和 *Bam*H I双酶切鉴定重组质粒).

Note: In Figure ABC, A. PCR amplification fragment mCherry (1~2. PCR amplification fragment mCherry);B. PCR identification of colony pET29(b) -mCherry (2.Negative clone;1,3,4. Positive clone);C. pET29(b) -mCherry recombinant plasmid digestion identification (1. Empty vector control pET29-b (+);2. Double enzyme identification of recombinant plasmid with *Sal* I and *Bam*H I).

3.2 pET29(b)-mCherry 和 pET29(b)-sGFP 的原核表达与纯化鉴定

将质粒载体转化至 BL21(DE3)中，加入 IPTG 诱导目的蛋白表达。经 SDS-PAGE 检测，与未诱导对照组相比，在 30 kDa 处出现 mCherry（图 3.2-1 A）和 sGFP（图 3.2-2 C）条带，与预期蛋白相对分子量（28 kDa）位置基本一致，诱导表达成功。使用试剂盒纯化两种荧光蛋白，进行 SDS-PAGE 检测，结果显示，在相对分子质量 30 kDa 处出现明显目的条带 mCherry（图 3.2-1 B）和 sGFP（图 3.2-2 D），且基本无其他杂带。

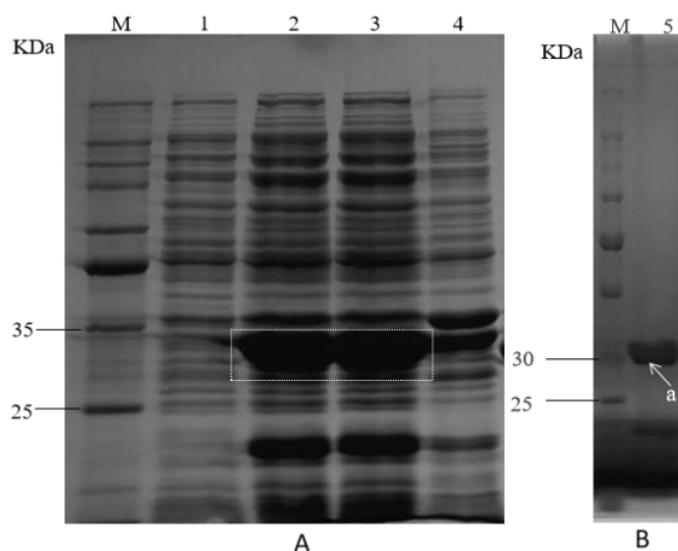


图 3.2-1. mCherry 荧光蛋白诱导表达及纯化

Figure 3.2-1. Induced expression and purification of mCherry fluorescent proteins

注:A: 1.对照组,mCherry 未诱导菌体; 2.破菌后 mCherry 总蛋白; 3.破菌后 mCherry 上清; 4.破菌后 mCherry 沉淀;白色方框为表达的 mCherry 荧光蛋白条带. B: 5.纯化后 mCherry.蛋白条带; M.蛋白质标准分子量.

Note: A: mCherry fluorescent protein; 1. Control group,mCherry not induce bacteria; 2. total protein of mCherry; 3. the supernatant of mCherry; 4. the precipitate of mCherry after bacteria destruction; B: 5. Protein band of purified mCherry; M. Protein standard molecular weight.

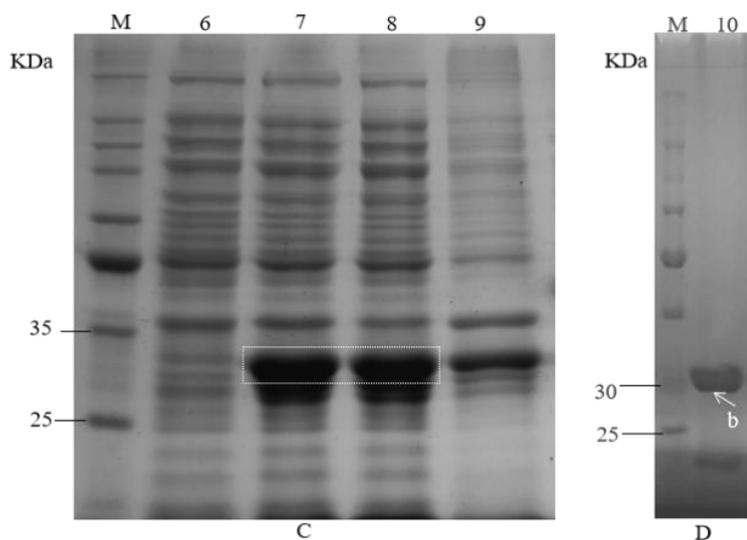


图 3.2-2. sGFP 荧光蛋白诱导表达及纯化

Figure 3.2-2. Induced expression and purification of sGFP fluorescent proteins

注:C: 6.对照组,sGFP 未诱导菌体;7.破菌后 sGFP 总蛋白;8.破菌后 sGFP 上清;9.破菌后 sGFP 沉淀;D: 10.纯化后 sGFP 蛋白条带;M.蛋白质标准分子量.白色方框为表达的 sGFP 荧光蛋白条带

Note: C: 6. Control group, sGFP not induce bacteria;7. total protein of sGFP after bacteria destruction;8. the supernatant of sGFP after bacteria destruction; 9. precipitation of sGFP after bacteria destruction; D: 10. Protein bands of Purified sGFP; M. Standard molecular weight of protein

3.3 sGFP 蛋白的去标签化观察与检测

由于 pET29(b)-sGFP 本身带有 His-Tag, 故加入 Beads 后 sGFP 会吸附到凝胶上, 对该混合物进行离心, 结果显示离心后的上清中呈现无色透明, 而可见光下 Beads 即呈现荧光 (图 3.3-1 A)。将上部液体全部移除, 加入 PBS 重悬 Beads 蛋白结合物, 加入 thrombin 对 sGFP 进行切割标签。经 thrombin 充分切割后, 对样品进行离心, 此时结果表现明显, Beads 不再呈现荧光, 而上清溶液呈现绿色荧光 (图 3.3-1 B.C), 可以基本确认 sGFP 所携带的组氨酸标签已去除。使用激光共聚焦显微镜对去标签后的 sGFP 进行检测, Beads 不呈现荧光 (图 3.3-2), 进一步证明了后续实验中使用的 sGFP 蛋白已不再带有组氨酸标签。

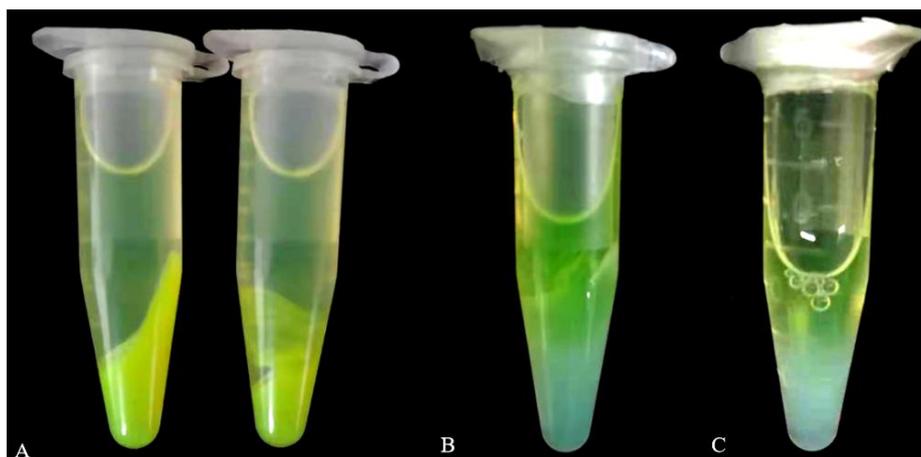


图 3.3-1 凝血酶切割 sGFP 蛋白标签

Figure 3.3-1 Thrombin cleaved sGFP protein labels

注: A.sGFP 与 Beads 旋转孵育离心后,sGFP 与 Beads 结合; B 和 C.均为凝血酶切割 16 小时后,sGFP 不再与 Beads 结合。

Note: A. sGFP and Beads are combined after rotation incubation and centrifugation. B and C. sGFP not bind with Beads by thrombin cutting after 16 hours.

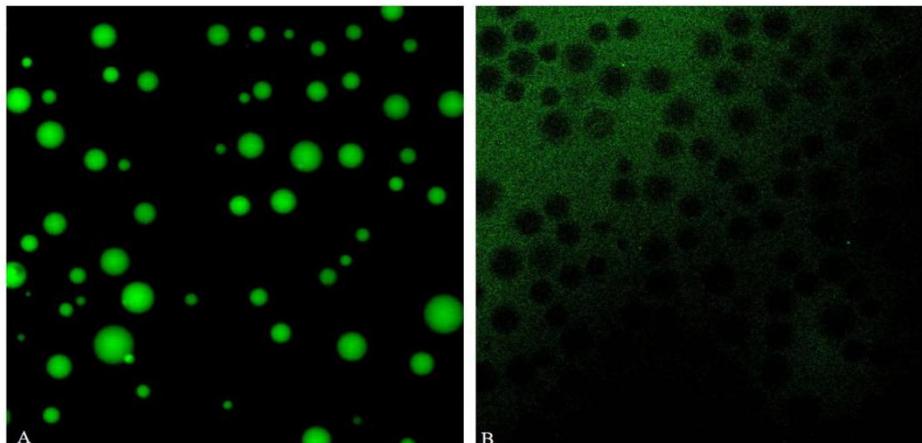


图 3.3-2 组氨酸标签切割前后 Beads 的显微镜图像

Figure. 3.3-2 Microscopic images of Beads before and after His-Tag label cutting

注: A.凝血酶加入前, sGFP 与 Beads 结合, 在激光共聚焦显微镜下的图像; B.凝血酶切割标签后, Beads 在激光共聚焦显微镜下的观察结果。

Note: A. Before thrombin is added, sGFP and Beads are combined in the laser confocal microscope image. B. After thrombin cutting of His-Tag, Beads are observed under the laserconfocal microscope.

3.4 mCherry 和 sGFP 蛋白浓度检测

3.4.1 戊二醛实验组中 mCherry 和 sGFP 蛋白浓度

采用 Bradford 法, 在 A595 nm 下检测吸光值, 制得浓度标准曲线(图 3.4-1), 计算得到戊二醛交联剂实验中 mCherry 蛋白溶液浓度为 1.537 mg/mL, sGFP 蛋白溶液浓度为 1.068 mg/mL。

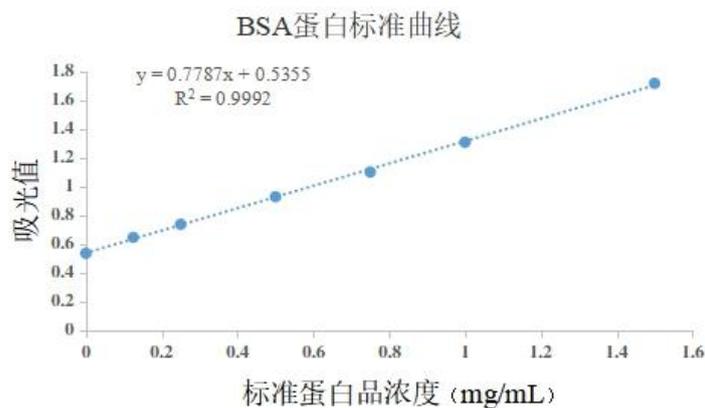


图 3.4-1 BSA 蛋白标准曲线(戊二醛实验组)

Figure 3.4.1 protein standard curve of BSA protein

3.4.2 甲醛实验组中 mCherry 和 sGFP 蛋白浓度

甲醛交联剂实验中, 利用相同方法, 制得蛋白浓度测量曲线(图 3.4-2), 测得待用样品中 mCherry 蛋白溶液浓度为 0.933 mg/mL, sGFP 蛋白溶液浓度为 0.936 mg/mL。

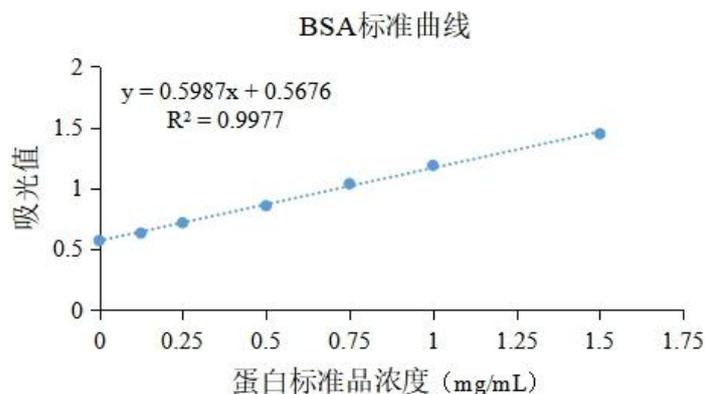


图 3.4-2 BSA 蛋白标准曲线(甲醛实验组)

Figure 3.4.2 protein standard curve of BSA protein

3.5 双分子荧光蛋白戊二醛交联结果分析

3.5.1 戊二醛交联剂最佳交联浓度优化检测

在 483 nm 激发波长下，检测不同交联浓度样品溶液中剩余 sGFP 荧光强度，96 孔板检测结果显示 5 个不同交联浓度中，1.0%、1.5%、2.0% 样品中 sGFP 荧光强度低于 0.1%、0.5%、（荧光强度由强到弱表现为赤橙黄绿青蓝紫，图 3.5-1 A）。荧光强度彩色立体图显示，在 1.0% 交联浓度下，荧光强度较低于 1.5%、2.0%（图 3.5-1 B）。将 5 组样品检测的 3 次平均荧光强度进行统计，结果显示 1.0% 戊二醛交联浓度，与 Ni NTA Beads 孵育吸附后剩余溶液中 sGFP 荧光强度处于最低值（图 3.5-1 C）。

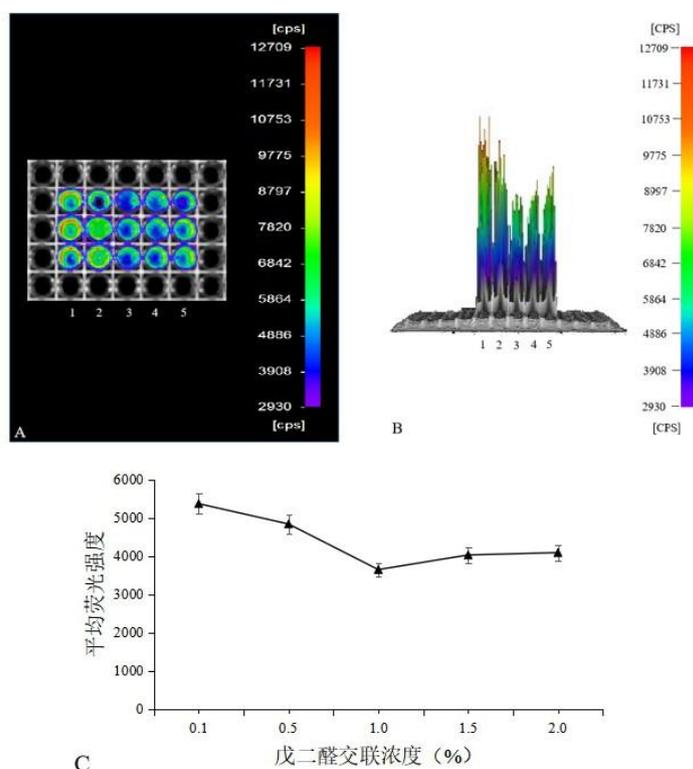


图 3.5-1 戊二醛最佳交联浓度优化检测

Figure 3.5-1 Optimized detection of the optimal cross-linking concentration of glutaraldehyde

注: A. 植物活体影像仪中检测 sGFP 荧光强度. 1. 0.1% 戊二醛交联浓度; 2. 0.5% 戊二醛交联浓度; 3. 1.0% 戊二醛交联浓度; 4. 1.5% 戊二醛交联浓度; 5. 2.0% 戊二醛交联浓度. B. 荧光强度彩色立体图. C. 平均荧光强度测定曲线.

Note :A. Detection of sGFP fluorescence intensity in plant vivisection imaging apparatus. 1. Cross linking concentration of 0.1% glutaraldehyde; 2. Cross linking concentration

of 0.5% glutaraldehyde; 3. 1.0% glutaraldehyde cross-linking concentration; 4. 1.5% glutaraldehyde cross-linking concentration; B. Color stereogram of fluorescence intensity; C. Measurement curve of average fluorescence intensity.

3.5.2 戊二醛交联剂交联效果直观化检测及效率统计

取 5 μL 全新 Ni NTA Beads 置于激光共聚焦显微镜下，分别打开 594 nm 和 488 nm 激发波长，结果显示，全新的 Ni NTA Beads 不呈现荧光（图 3.5-2 A，图 3.5-2 B）。取等量的未加入交联剂的阴性对照样品进行显微镜观察，结果显示，在 594 nm 激发波长下，Ni NTA Beads 呈现红色荧光，带有 His 标签的 mCherry 已经与 Ni NTA Beads 结合，而在 488 nm 激发波长下，并未呈现绿色荧光，去除标签后的 sGFP 不再与 Ni NTA Beads 结合。

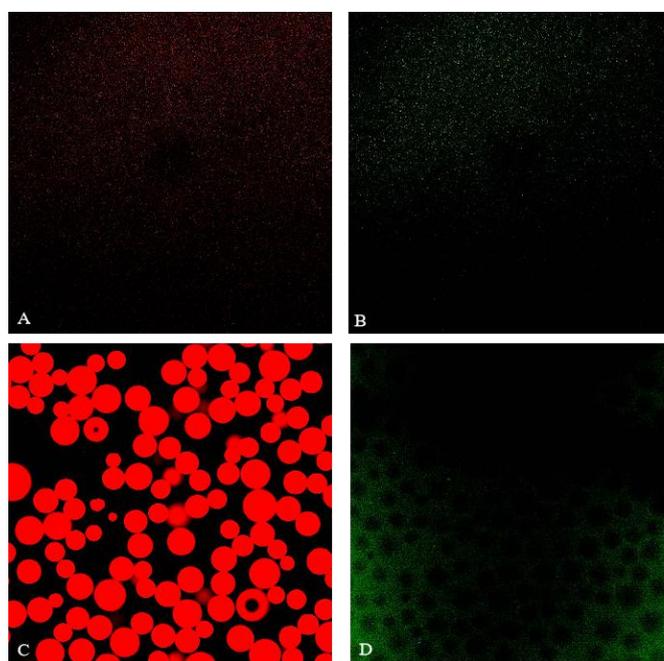


图 3.5-2 激光共聚焦显微镜检测对照组

Figure 3.5-2 Control group detected by laser confocal microscope

注: A. Ni NTA Beads 在 594 nm 激发波长下的图像; B. Ni NTA Beads 在 488 nm 激发波长下的图像; C. 对照组，未加入交联剂样品在 594 nm 激发波长下的图像; D. 对照组，未加入交联剂样品在 488 nm 激发波长下的图像。

Note: A. The image of Ni NTA Beads at 594 nm excitation; B. The image of Ni NTA Beads at 488 nm excitation; C. The image of the control group, without cross-linking agent at 594 nm excitation wavelength; D. Image of control group without cross-linking agent at 488 nm excitation wavelength.

将 5 组实验组样品各取 5 μ L Ni NTA Beads 置于载玻片上进行激光共聚焦显微镜观察，同时打开 594 nm 和 488 nm 激发波长，观察结果显示，每一个交联浓度下，均存在呈现双荧光（黄色）的 Beads，证明 5 个实验组样品均发生 mCherry 和 sGFP 的交联反应。并且随着戊二醛交联浓度的上升，1.0%（图 3.5-3 C）、1.5%（图 3.5-3 D）、2.0%（图 3.5-3 E）相比于 0.5%（图 3.5-3 B）、0.1%（图 3.5-3 A），呈现红色荧光 Beads 的数目减少，呈现双荧光的 Beads 数目增多。利用 cellSens Standard 软件对以下结果进行分析，统计视野下 Beads 的总数以及呈现双荧光 Beads 的数目（表 3.5-1），计算 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 交联浓度中呈现双荧光 Beads 的占比分别为：47.4%、67.9%、95.6%、93.5%、93.9%（图 3.5-3 F）。1%、1.5%、2% 交联效果优于 0.5%、0.1%，且在 1.0% 交联浓度时，存在较高的交联效率。结合戊二醛最佳交联浓度优化结果及本交联效率统计结果，故在后续实验中，采用 1.0% 戊二醛浓度进行交联。

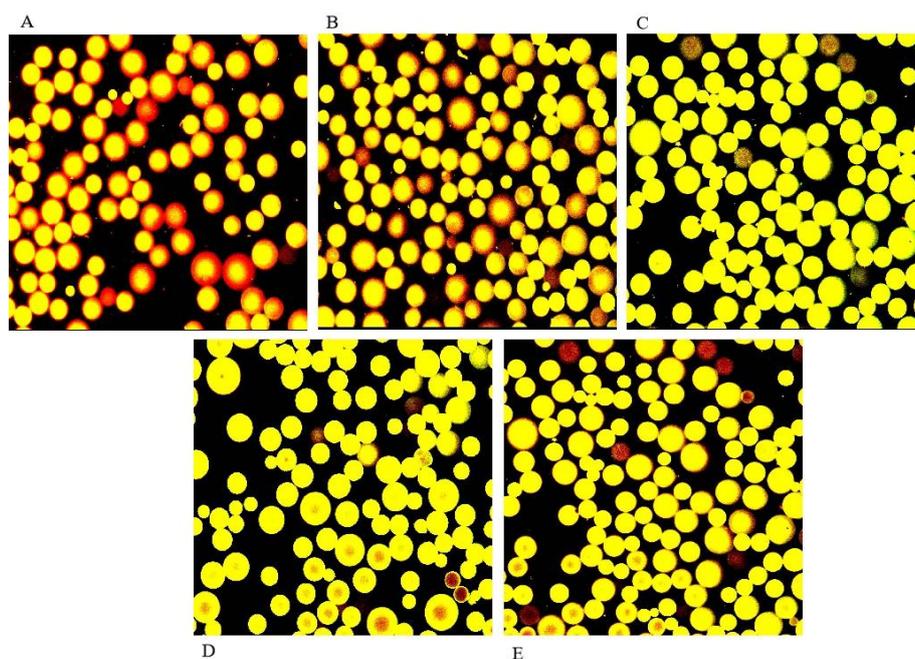


图 3.5-3 不同戊二醛交联浓度显微镜观察图及结果统计

Fig. 3.5-3 Microscopic observation of different concentrations of glutaraldehyde cross-linking and statistics of the results

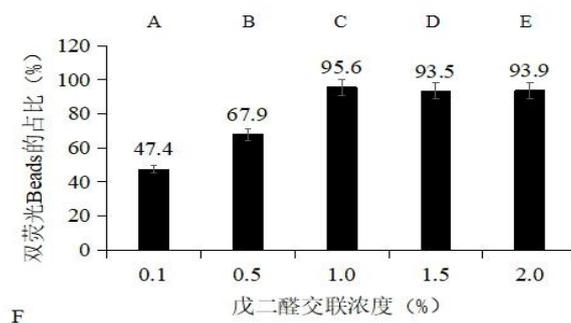


图 3.5-3 不同戊二醛交联浓度显微镜观察图及结果统计

Figure. 3.5-3 Microscopic observation of different concentrations of glutaraldehyde cross-linking and statistics of the results

注: A. 0.1%戊二醛交联; B. 0.5%戊二醛交联; C. 1.0%戊二醛交联; D. 1.5%戊二醛交联; E. 2.0%戊二醛交联; F. 不同浓度交联 cellSens Standard 分析结果柱状图.

Note: A. 0.1% glutaraldehyde cross-linked; B. 0.5% glutaraldehyde cross-linked; C. 1.0% glutaraldehyde cross-linked; D. 1.5% glutaraldehyde cross-linked; E. 2.0% glutaraldehyde cross-linked; F. Histogram of cross-linked Cellsens Standard analysis results at different concentrations.

表 3.5-1 不同戊二醛交联浓度观察图结果统计

Tab. 3.5-1 Statistics of the results of different cross-linked concentrations of glutaraldehyde

交联浓度 个数统计	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
双荧光 Beads 数目	46	89	109	101	123
视野下 Beads 总数	97	131	114	108	131

3.5.3 微量检测非等比例双分子荧光蛋白的戊二醛交联

为了研究荧光蛋白溶液在非等比例摩尔浓度下,以及进一步验证本技术的灵敏性,我们设计了仅加入 1 μL 的一种荧光蛋白溶液,另一种荧光蛋白溶液加入量按照固定摩尔浓度比例加入,以验证在微量且非等比例荧光蛋白溶液中,本技术检测交联剂是否发生作用的效力。

(1) 微量检测定量 sGFP 与不同浓度比例的 mCherry 的交联结果

1.0%戊二醛交联定量 sGFP 与不同比例浓度的 mCherry 的结果显示(图

3.5-4), 在 mCherry 和 sGFP 蛋白溶液摩尔比例为 1:3, 总体积为 3 μ L 的情况下, 激光共聚焦显微镜观察呈现双荧光 (黄色) 的 Beads (图 3.5-4 A), 证明交联作用已经发生。并且随着 mCherry 浓度的增高, 呈现红色荧光的 Beads 数目不断增加, 并逐渐覆盖被交联的 sGFP 所发出的绿色荧光。对该组观察结果进行统计分析 (表 3.5-2), 结果显示, 呈现双荧光的 Beads 在视野下 Beads 总数目的占比从最高的 37.5% 逐渐降低, 到 1:21 (图 3.5-4 D) 比例时已经无法检测出 sGFP 发出的绿色荧光, 整体表现为双荧光的 Beads 的占比随 mCherry 浓度增加而降低 (图 10F)。

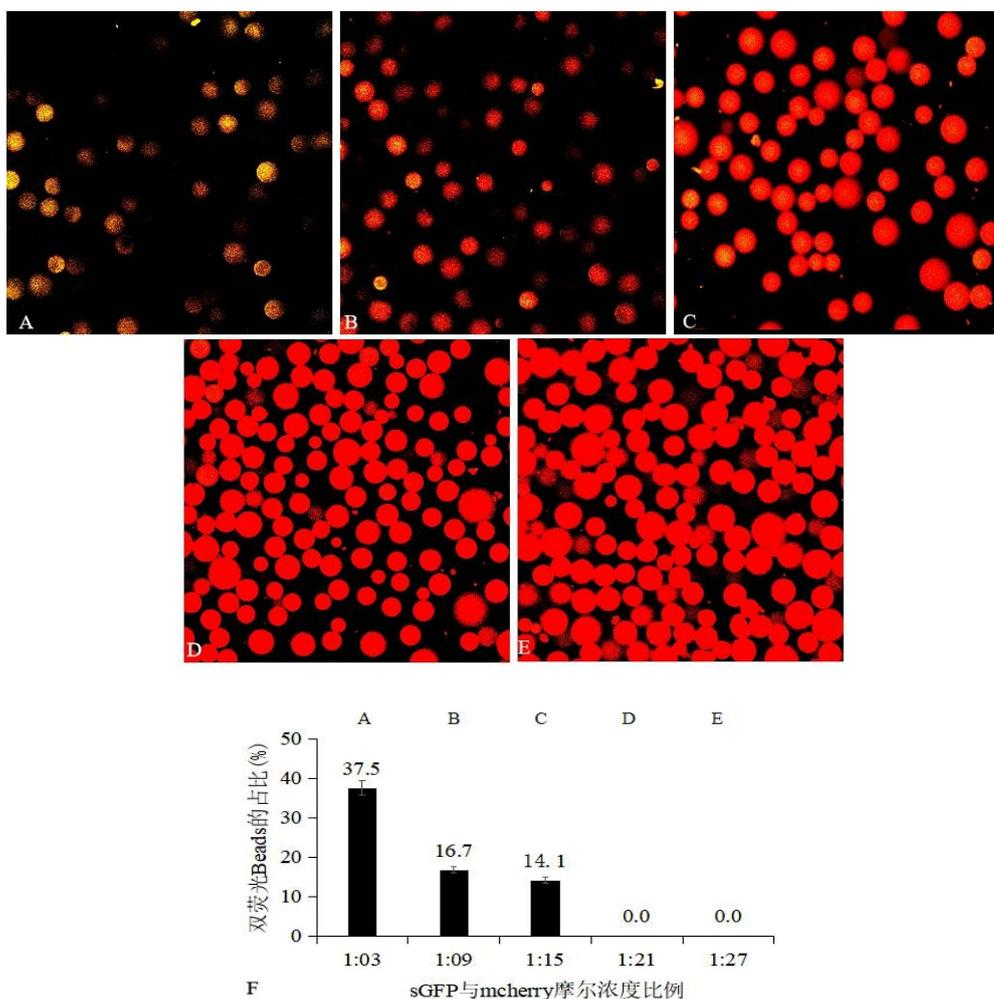


图 3.5-4 微量检测定量 sGFP 与不同浓度 mCherry 的戊二醛交联及结果分析

Figure 3.5-4. Quantitative sGFP and different concentrations of mCherry was cross-linked with glutaraldehyde

注: A.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:3 在激光共聚焦显微镜下的结果图像;
B.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:9 的结果图像; C.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例

为 1:15 的结果图像；D.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:21；E.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:27。F.本次微量检测的 cellSens Standard 软件分析结果柱状图。

Note: A. sGFP and mCherry with a molar concentration ratio of 1:3 in the confocal laser microscope image; B. Results with the molar concentration ratio of sGFP to mCherry 1:9; C. sGFP and mCherry molar concentration ratio of 1:15; D. sGFP and mCherry the molar concentration ratio of 1:21; E.The molar concentration ratio of sGFP to mCherry was 1:27. F. Column chart of analysis results of Cellsens Standard software for this trace detection.

表 3.5-2 微量检测定量 sGFP 与不同浓度 mCherry 的戊二醛交联结果统计

Table 3.5-2 Statistical results of cross-linked between sGFP and different concentrations of mCherry with glutaraldehyde

样品浓度比例 个数统计	mCherry with glutaraldehyde				
	1:03	1:09	1:15	1:21	1:27
双荧光 Beads 数目	15	8	10	0	0
视野下 Beads 总数	40	48	71	130	135

(2) 微量检测定量 mCherry 与不同浓度比例的 sGFP 的交联结果

1.0%戊二醛交联定量 mCherry 与不同比例浓度的 sGFP 的结果显示，随着 sGFP 荧光蛋白溶液浓度的增加，显微镜下呈现双荧光 Beads 的数目逐渐减少，Beads 上激发发出的绿色荧光显著增强（图 3.5-5）。利用 cellsens standard 软件对共聚焦荧光显微镜下拍摄结果进行数目统计（表 3.5-3）及分析，结果显示，呈现双荧光 Beads 的占比由 1:3 比例中的 40.0%降低至 1:27 比例中的 3.0%（图 3.5-5 F）。

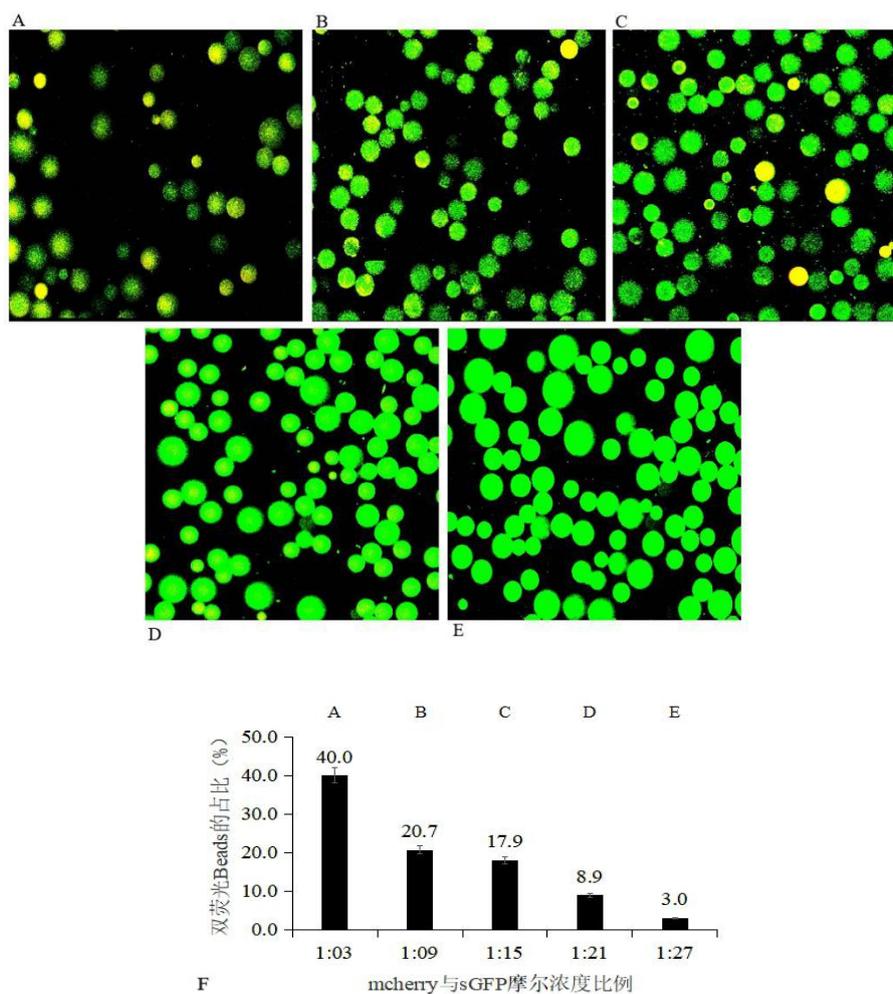


图 3.5-5 微量检测定量 mCherry 与不同浓度 sGFP 的戊二醛交联

Figure 3.5-5. Quantitative trace detection mCherry and different concentrations of sGFP was cross-linked with glutaraldehyde.

注：A.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:3 在激光共聚焦显微镜下的结果图像；B.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:9 的结果图像；C.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:15 的结果图像；D.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:21；E.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:27。F.本次微量检测的 cellSens Standard 软件分析结果柱状图。

Note: A. mCherry and sGFP with a molar concentration ratio of 1:3 in the confocal laser microscope image; B. Results with the molar concentration ratio of mCherry to sGFP 1:9; C. mCherry and sGFP molar concentration ratio of 1:15; D. mCherry and sGFP the molar concentration ratio of 1:21; E.The molar concentration ratio of mCherry and sGFP was 1:27; F. Column chart of analysis results of Cellsens Standard software for this trace detection.

表 3.5-3 微量检测定量 mCherry 与不同浓度 sGFP 的戊二醛交联结果统计

Table 3.5-3 Statistical results of cross-linked between mCherry and different concentrations of sGFP with glutaraldehyde

样品浓度比例 个数统计	of sGFP with glutaraldehyde				
	1:03	1:09	1:15	1:21	1:27
双荧光 Beads 数目	20	12	14	8	3
视野下 Beads 总数	50	58	78	90	100

3.6 双分子荧光蛋白甲醛交联结果分析

3.6.1 甲醛交联剂最佳交联浓度优化检测

利用相同方法，对甲醛交联剂进行检测，结果显示，在 1.5%、2.0%交联浓度下，收集到的溶液中 sGFP 荧光强度低于 0.1%、0.5%、1.0%、2.5%（图 3.6-1 A），荧光强度彩色立体柱状图同样表明，在 1.5%、2.0%交联浓度中，检测到的荧光强度要低于其他 4 组交联浓度（图 3.6-1 B）。平均荧光强度统计结果显示，在 1.5%甲醛交联浓度时，sGFP 荧光强度呈现最低值（图 3.6-1 C）。

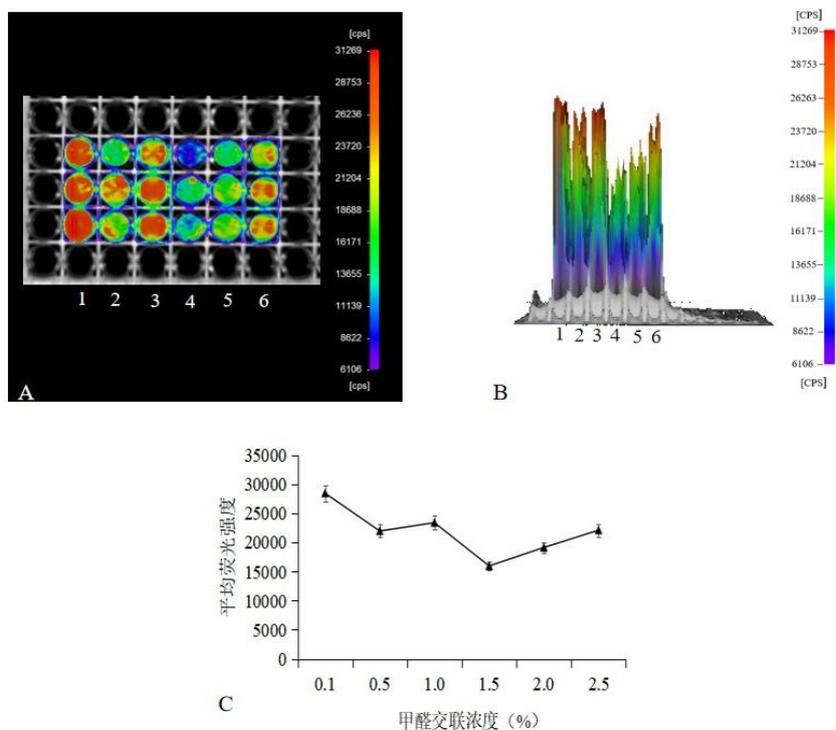


图 3.6-1 甲醛最佳交联浓度优化检测

Figure 3.6-1 Optimized detection of the optimal cross-linking concentration of formaldehyde

注: A. 植物活体影像仪中检测 sGFP 荧光强度。1. 0.1% 甲醛交联浓度; 2. 0.5% 甲醛交联浓度; 3. 1.0% 甲醛交联浓度; 4. 1.5% 甲醛交联浓度; 5. 2.0% 甲醛交联浓度; 6. 2.5% 甲醛交联浓度; B. 荧光强度彩色立体图; C. 平均荧光强度测定曲线。

Note: A. The fluorescence intensity of sGFP was detected in the plant living instrument. 1. 0.1% formaldehyde cross-linked concentration; 2. Cross-linking concentration of 0.5% formaldehyde; 3. 1.0% formaldehyde cross-linking concentration; 4. 1.5% formaldehyde cross-linking concentration; 5. 2.0% formaldehyde cross-linking concentration; 6. 2.5% formaldehyde cross-linking concentration; B. Color stereogram of fluorescence intensity; C. Measurement curve of average fluorescence intensity.

3.6.2 甲醛交联剂交联效果直观化检测及效率统计

取 5 μL 全新 Ni NTA Beads 置于激光共聚焦显微镜下, 分别打开 594 nm 和 488 nm 激发波长, 结果显示, 新的 Ni NTA Beads 不呈现荧光 (图 3.6-2 A, 图 3.6-2 B)。取等量的未加入交联剂的阴性对照样品进行显微镜观察, 结果显示, 在 594 nm 激发波长下, Ni NTA Beads 呈现红色荧光, 带有 His 标签的 mCherry 已经与 Ni NTA Beads 结合, 而在 488 nm 激发波长下, 并未呈现绿色荧光, 去除标签后的 sGFP 不再与 Ni NTA Beads 结合。

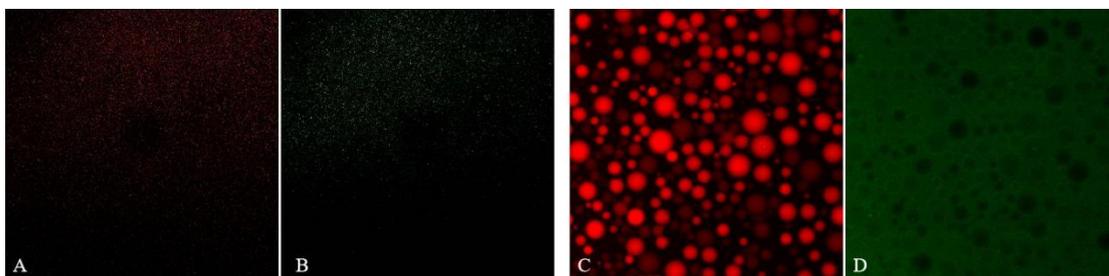


图 3.6-2 激光共聚焦显微镜检测对照组

Figure 3.6-2 Control group detected by laser confocal microscope

注: A. Ni NTA Beads 在 594 nm 激发波长下的图像; B. Ni NTA Beads 在 488 nm 激发波长下的图像; C. 对照组, 未加入交联剂样品在 594 nm 激发波长下的图像; D. 对照组, 未加入交联剂样品在 488 nm 激发波长下的图像。

Note: A. The image of Ni NTA Beads at 594 nm excitation; B. The image of Ni NTA Beads at 488 nm excitation; C. The image of the control group, without cross-linking agent at 594 nm excitation wavelength; D. Image of control group without cross-linking agent at 488 nm excitation wavelength.

对甲醛交联剂的 6 组实验样品进行观察检测及对结果进行统计分析,结果显示,每一组交联样品,均存在呈现双荧光(黄色)Beads,且 0.5%交联浓度起,呈现双荧光 Beads 显著增多(图 3.6-3),较高浓度的甲醛交联效果要优于 0.1%。cellSens Standard 软件分析结果表明,在 1.5%浓度交联时,其交联效率达到 90.9%,较高于 1.0%、2.0%、2.5%交联浓度(图 3.6-3 H)。结合甲醛最佳交联浓度优化结果及本交联效率统计,因此,采用 1.5%作为甲醛最佳交联浓度。

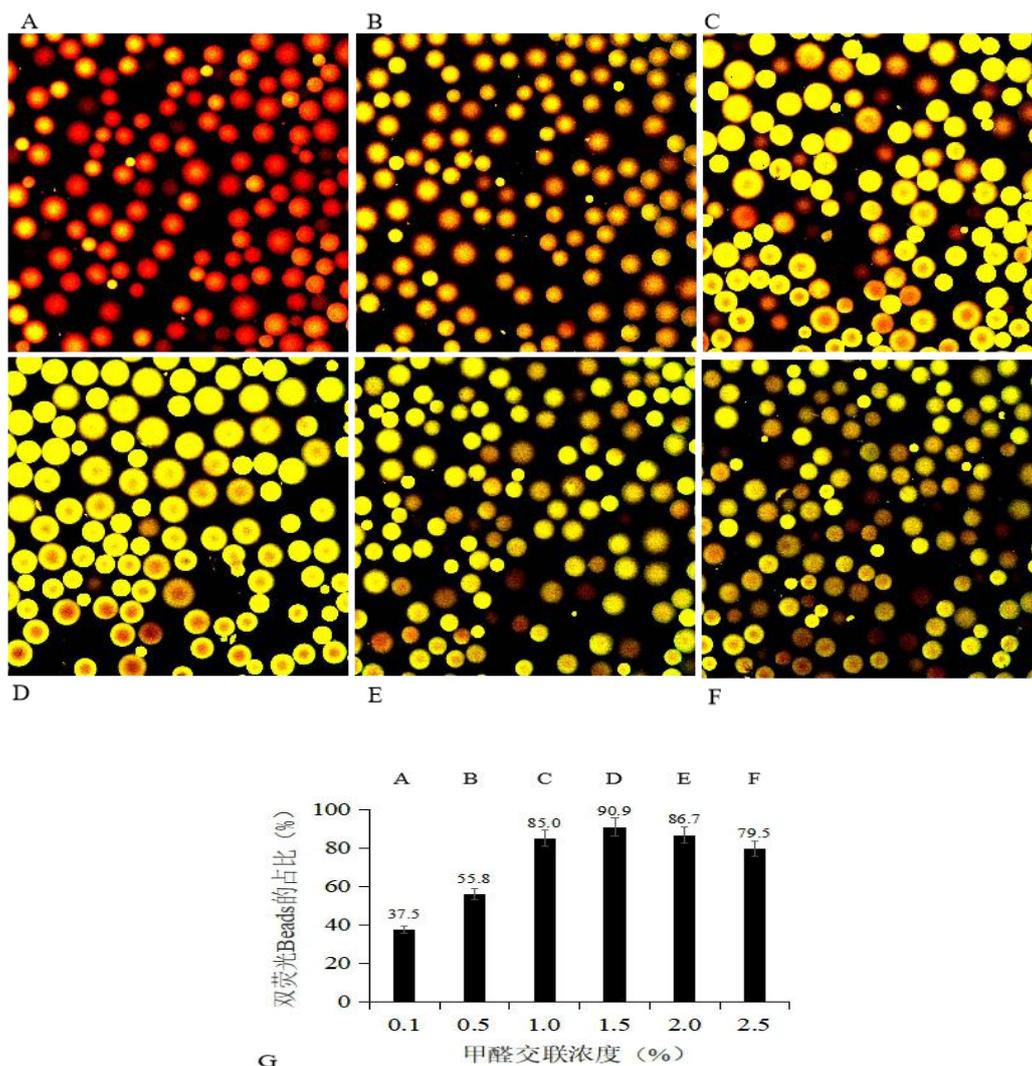


图 3.6-3 不同甲醛交联浓度激光共聚焦显微镜观察图及结果统计

Figure 3.6-3 Laser confocal microscope observation of different formaldehyde cross-linked concentrations and statistics of the results

注: A. 0.1%甲醛交联; B. 0.5%甲醛交联; C. 1.0%甲醛交联; D. 1.5%甲醛交联; E. 2.0%甲醛交联; F. 2.5%甲醛交联不同浓度交联; G.cellSens Standard 分析结果柱状图。

Note: A. 0.1% formaldehyde cross-linked concentration; B. 0.5% formaldehyde cross-li

nked concentration; C. 1.0% formaldehyde cross-linked concentration; D. 1.5% formaldehyde cross-linked concentration; E. 2.0% formaldehyde cross-linked concentration; F. 2.5% formaldehyde cross-linked concentration; G. The histogram of Cellsens Standard analysis results.

表 3.6-1 不同甲醛交联浓度观察图结果统计

Table 3.6-1 Statistics of the results of the observation chart of cross-linked concentrations of different formaldehyde

交联浓度 个数统计	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%
双荧光 Beads 数目	48	67	102	100	98	105
视野下 Beads 总数	128	120	120	110	113	132

3.6.3 微量检测非等比例双分子荧光蛋白的甲醛交联结果

(1) 微量检测定量 sGFP 与不同浓度比例的 mCherry 的交联结果

采用相同技术路线,对甲醛交联剂进行重复验证本技术的稳定性,共聚焦显微镜下观察结果(图 3.6-4)与戊二醛结果呈现相似趋势,分别在 sGFP:mCherry=1:3、1:9、1:15 样品中检测到呈现双荧光的 Beads(图 3.6-4 A.B.C),并随着 mCherry 浓度再次增加,无法检测出呈现双荧光的 Beads。且在 1:3 比例,荧光蛋白总体积为 4 μL 样品中,依旧可以灵敏地检测出交联结果(图 3.6-4 A)。

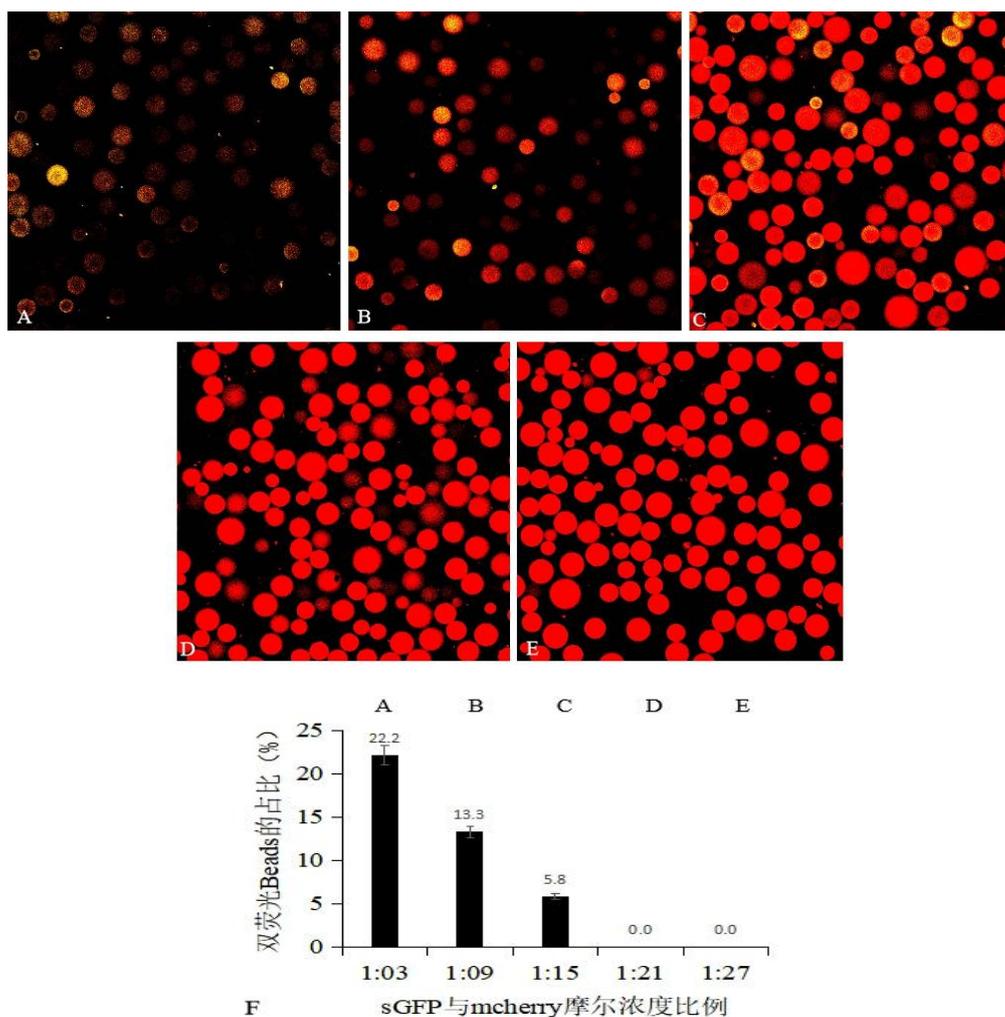


图 3.6-4 微量检测定量 sGFP 与不同浓度 mCherry 的甲醛交联

Figure 3.6-4. Quantitative trace detection sGFP was cross-linked with formaldehyde of different concentrations of mCherry

注：A.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:3 在激光共聚焦显微镜下的结果图像；B.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:9 的结果图像；C.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:15 的结果图像；D.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:21；E.sGFP 与 mCherry 的摩尔浓度比例为 1:27。F.本次微量检测的 cellSens Standard 软件分析结果柱状图。

Note: A. sGFP and mCherry with a molar concentration ratio of 1:3 in the confocal laser microscope image; B. Results with the molar concentration ratio of sGFP to mCherry 1:9; C. sGFP and mCherry molar concentration ratio of 1:15; D. sGFP and mCherry the molar concentration ratio of 1:21; E.The molar concentration ratio of sGFP to mCherry was 1:27. F. Column chart of analysis results of CellSens Standard software for this trace detection.

表 3.6-2 微量检测定量 sGFP 与不同浓度 mCherry 的甲醛交联结果统计

Table 3.6-2 Statistical results of cross-linking between quantitative sGFP and formaldehyde of different concentrations of mCherry

个数统计	样品浓度比例				
	1:03	1:09	1:15	1:21	1:27
双荧光 Beads 数目	12	8	7	0	0
视野下 Beads 总数	54	60	120	122	112

(2) 微量检测定量 mCherry 与不同浓度比例的 sGFP 的交联结果

甲醛交联剂定量 mCherry 与不同比例浓度的 sGFP 交联结果同样呈现了相似趋势，随着 sGFP 浓度比例由 3 倍增长至 27 倍，显微镜下呈现双荧光 Beads 的占比逐渐减少（图 3.6-5 F），Beads 激发呈现绿色荧光愈加明显（图 3.6-5）。两种交联剂的微量检测非等比例蛋白交联结果验证了本研究技术的灵敏性与可利用稳定性，为利用该技术筛选其他种类化学交联剂提供了证据支持。

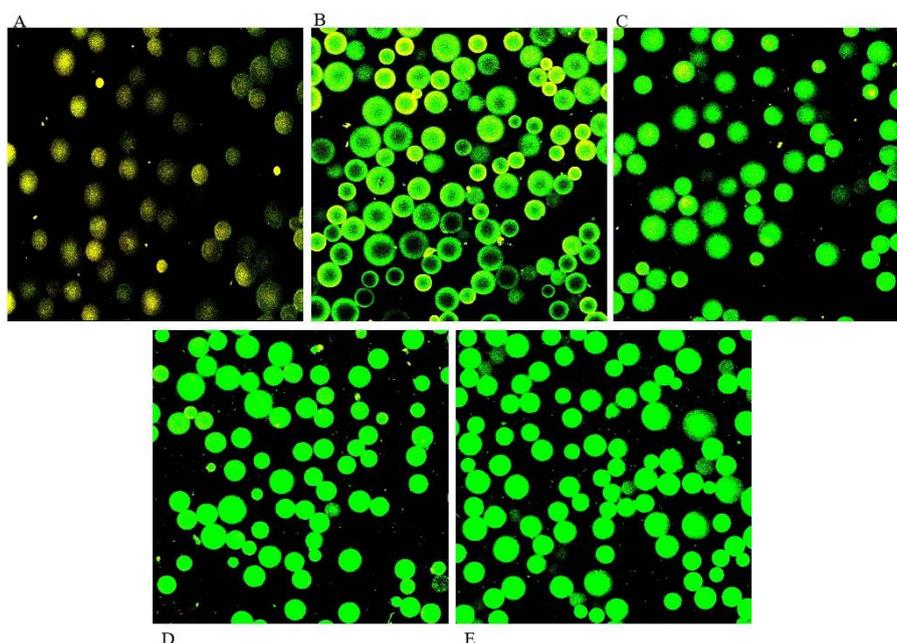


图 3.6-5 微量检测定量 mCherry 与不同浓度 sGFP 的甲醛交联

Figure 3.6-5. Quantitative trace detection mCherry and different concentrations of sGFP was cross-linked with formaldehyde.

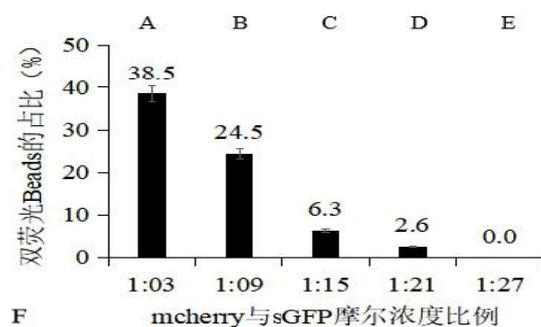


图 3.6-5 微量检测定量 mCherry 与不同浓度 sGFP 的甲醛交联

Figure 3.6-5. Quantitative trace detection mCherry and different concentrations of sGFP was cross-linked with formaldehyde.

注：A.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:3 在激光共聚焦显微镜下的结果图像；B. mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:9 的结果图像；C.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:15 的结果图像；D.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:21；E.mCherry 与 sGFP 的摩尔浓度比例为 1:27。F.本次微量检测的 cellSens Standard 软件分析结果柱状图。

Note: A. mCherry and sGFP with a molar concentration ratio of 1:3 in the confocal laser microscope image; B. Results with the molar concentration ratio of mCherry to sGFP 1:9; C. mCherry and sGFP molar concentration ratio of 1:15; D. mCherry and sGFP the molar concentration ratio of 1:21; E.The molar concentration ratio of mCherry and sGFP was 1:27. F. Column chart of analysis results of Cellsens Standard software for this trace detection.

表 3.6-3 微量检测定量 mCherry 与不同浓度 sGFP 的甲醛交联结果统计

Table 3.6-3 Statistics of cross-linking results of trace detection quantitative mCherry and

formaldehyde with different concentrations of sGFP					
样品浓度比例	1:03	1:09	1:15	1:21	1:27
个数统计					
双荧光 Beads 数目	20	27	4	2	0
视野下 Beads 总数	52	110	64	78	110

3.7 SDS-PAGE 辅助检测结果分析

为进一步鉴定戊二醛成功交联两种荧光蛋白，采用 SDS-PAGE 技术检测不同交联浓度样品，从图 9 中可以看出，与对照组（图 3.7 C）相比，5 组不同交联浓度均在 55 kDa 处出现明显特异条带，证明戊二醛已经促使溶液中的荧光蛋白发生交联，形成该条带（图 3.7 A 黑色箭头处）。此外，我们还发现在 100 kDa 处，5 个样品中也存在一定特异条带（图 3.7 A 白色箭头），这可能是由于戊二醛引起多个荧光蛋白发生交联而产生的特异条带。甲醛交联 SDS-PAGE 检测结果表明，6 组交联浓度与对照相比，均在 52 kDa 处附近出现特异条带（图 3.7 B 白色箭头），证明这 6 组交联浓度均已使荧光蛋白发生交联。SDS-PAGE 辅助检测结果表明，两种交联剂即使在较低浓度下，也可以使荧光蛋白发生交联。激光共聚焦显微镜对实验样品组的 Beads 观察结果也显示，两种交联剂每一组交联浓度，均观察到存在呈现双荧光的 Beads，证明交联已经发生，这与本次 SDS-PAGE 辅助检测结果一致。

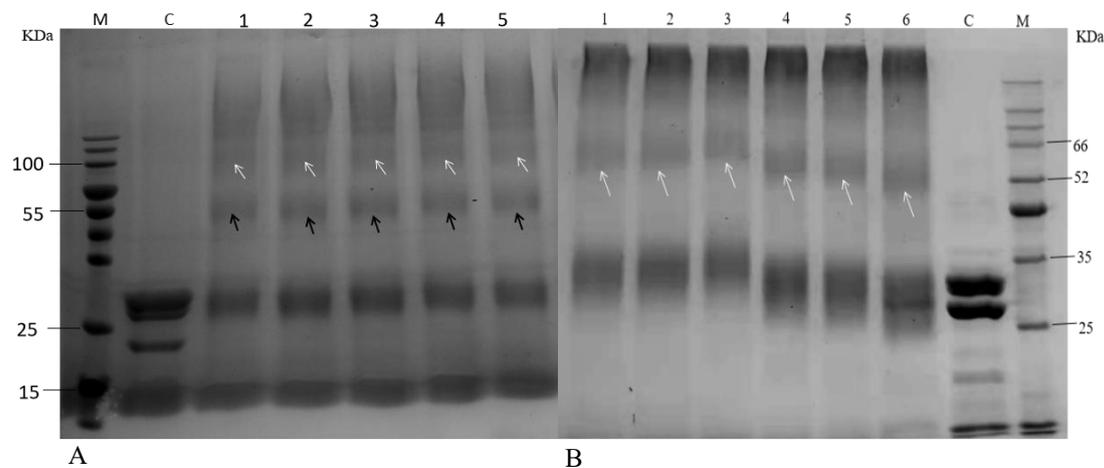


图 3.7 SDS-PAGE 检测交联剂不同浓度交联结果

Figure 3.7 SDS-PAGE test results of cross-linking agent at different concentrations

注：A: M. 蛋白质标准分子量；C. 对照组，未加入戊二醛交联剂；1 至 5:分别为 0.1%戊二醛交联浓度、0.5%戊二醛交联浓度、1.0%戊二醛交联浓度、1.5%戊二醛交联浓度、2.0%戊二醛交联浓度. B: 1~6:分别为 0.1%甲醛交联浓度、0.5%甲醛交联浓度、1.0%甲醛交联浓度、1.5%甲醛交联浓度、2.0%甲醛交联浓度、2.5%甲醛交联浓度. C. 对照组，未加入甲醛交联剂；M. 蛋白质标准分子量.

Note: A: M. Protein standard molecular weight; C. Control without glutaraldehyde cross-linking agent; 1-5: 0.1% glutaraldehyde cross-linking density, concentration of 0.5% glutaraldehyde cross-linking, 1.0% glutaraldehyde cross-linking density, 1.5% glutaraldehyde cross-linking density, concentration of 2.0% glutaraldehyde cross-linking. B: 1-6: 0.1% formaldehyde cross-linking concentration and the concentration of 0.5% formaldehyde cross-linking, 1.0% formaldehyde cross-linking concentration and the concentration of 1.5% formaldehyde cross-linking, 2.0% formaldehyde cross-linking concentration and the concentration of 2.5 formaldehyde cross-linking. C. Control without formaldehyde cross-linking agent. M. Standard molecular weight of protein.

第四章 结论与展望

4.1 结论

本研究利用红色荧光蛋白 mCherry 和高可溶性绿色荧光蛋白 sGFP，通过组氨酸标签与 Ni NTA Beads 吸附结合，以及在成功交联 mCherry 和 sGFP 荧光蛋白的样品中，在 594 nm 和 488 nm 激发波长下，固相介质 Ni NTA Beads 会呈现双荧光即黄色荧光的特性，设计开发了本研究技术。主要用于体外检测化学交联剂交联蛋白质的效果，以快速、高通量筛选化学交联剂。相较于 SDS-PAGE 检测化学交联剂等的传统检测手段，可实现简便、快速、高效地在体外筛选化学交联剂。

本研究成功克隆带有组氨酸的 mCherry 基因原核质粒载体，并对 mCherry 和 sGFP 两种荧光蛋白进行诱导表达纯化，以获取纯化后的 mCherry 与无任何蛋白标签的 sGFP。在最佳交联浓度优化和交联结果直观化检测研究中，由于 sGFP 蛋白不含有组氨酸标签，故其能够吸附于 Ni NTA Beads 只依赖于交联剂的交联作用。而随着交联作用的增强，离心后收集到的交联溶液中 sGFP 含量会随之下降，植物影像仪所检测到的荧光强度也随之降低。在戊二醛交联剂研究中，sGFP 荧光强度出现最低值是在 1.0%浓度时，而在显微镜观察中，每组样品均存在呈现双荧光的 Ni NTA Beads，证明每一组交联浓度均已发生交联反应。且戊二醛交联的直观化检测结果表明，1.0%戊二醛交联浓度的交联作用是非常明显的，其交联效率也是相对最高的。使用甲醛作为交联剂，采用相同路线加以验证本研究技术，结果表明在 1.5%甲醛交联浓度下，sGFP 荧光强度存在最低值，同样在显微镜观察下，1.5%交联浓度也存在显著交联效果，及相对较高的交联效率。这证明，本研究技术在直观快速检测其他化学交联剂效果的应用上可能具有一定的普遍适用性。

在 SDS-PAGE 辅助检测交联结果的研究中，戊二醛和甲醛的实验结果再次表明，交联剂可促使荧光蛋白发生交联，进一步验证本研究技术检测结果的真实准确性。SDS-PAGE 是检测化学交联剂产生蛋白间发生交联的主要手段，该方法需要经过制胶、煮样、电泳、染色脱色等步骤，过程较为繁琐与复杂。而本技术路线可以在制备交联样品后利用荧光显微镜直观化对交联结果进行观察检测，具

有简便快速高效和直观的特性,在体外高通量初步筛选化学交联剂具有潜在的应用前景。

4.2 展望

本研究旨在利用两种荧光蛋白与固相介质,探索体外可视化、快速筛选化学交联剂的技术方法,以及对该交联剂效力进行鉴定。目的在于以此为基础,进一步完善体外快速初筛化学交联剂的方法。

研究表明,我们成功建立了体外快速、简便、可以高通量的化学交联剂效果及效率检测技术,本技术方法可以代替 SDS-PAGE 技术,实现检测化学交联剂是否使蛋白质间产生交联效果,并且大大缩减了时间的消耗以及技术上的繁琐。实验结果也表明,当交联效力较低或者交联并未发生时,无标签的 sGFP 荧光蛋白无法在激光共聚焦显微镜下捕捉到荧光,这就为初步筛选新型交联剂是否对蛋白质产生效力的检测奠定了理论基础。本研究方法,为新型化学交联剂的开发,特别是交联剂在蛋白质间交联效果的检测、效率的统计方面,提供了一定的技术支持。

不可否认,由于外在因素的影响,本实验中所使用到的化学交联剂还未能覆盖全部种类,这也将是本实验研究中下一步进行完善的方向。但尽管如此,戊二醛和甲醛交联剂实验结果说明,本研究方法操作简便,快速高效,基本建立了可以体外初步筛选化学交联剂的技术。

参考文献

- [1] Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., et al., Interactions among members of the Bcl₂ protein family analyzed with a yeast two-hybrid system [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91(20),9238-9242.
- [2] Prigent, M., Chaillot, J., Tisserand, H., et al. Three members of the yeast N-BAR proteins family form heterogeneous lattices in vivo and interact differentially with two RabGAP proteins [J]. Sci Rep, 2020,10(1),1698.
- [3] Shyu, Y. J., Hiatt, S. M., Duren, H. M., et al. Visualization of protein interactions in living *Caenorhabditis elegans* using bimolecular fluorescence complementation analysis [J]. Nature Protocols, 2008,3(4),588-596.
- [4] Zhang, H., Li, Y., Nie, J., et al. Structure-based dynamic analysis of the glycine cleavage system suggests key residues for control of a key reaction step [J]. Commun Biol, 2020,3(1),756-767.
- [5] Trzeciakiewicz, H., Ajit, D., Tseng, J. H., et al. An HDAC6-dependent surveillance mechanism suppresses tau-mediated neurodegeneration and cognitive decline. Nat Commun, 2020,11(1),5522.
- [6] Moreira, G., Kollner, S. M. S., Helmsing, S., et al. Pyruvate dehydrogenase complex-enzyme 2, a new target for *Listeria* spp. detection identified using combined phage display technologies [J]. Sci Rep, 2020,10(1),152-167.
- [7] Algar, W. R., Hildebrandt, N., Vogel, S. S., et al. FRET as a biomolecular research tool-understanding its potential while avoiding pitfalls [J]. Nat Methods, 2019,16(9),815-829.
- [8] Marcos-Torres, F. J., Volz, C., Muller, R., An ambruticin-sensing complex modulates *Myxococcus xanthus* development and mediates myxobacterial interspecies communication [J]. Nat Commun, 2020,11(1),55-63.
- [9] Schmidt, C., Robinson, C. V., A comparative cross-linking strategy to probe conformational changes in protein complexes [J]. Nat Protoc, 2014,9(9),2224-2236.

- [10] Bruckmann, C., Tamburri, S., De Lorenzi, V., et al. Mapping the native interaction surfaces of PREP1 with PBX1 by cross-linking mass-spectrometry and mutagenesis [J]. *Sci Rep*, 2020,10(1),16809.
- [11] Tran, B. Q., Goodlett, D. R., Goo, Y. A. Advances in protein complex analysis by chemical cross-linking coupled with mass spectrometry (CXMS) and bioinformatics [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016,164(1),123-129.
- [12] Kalkhof, S., Sinz, A. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008,392(1-2),305-312.
- [13] Deroo, S., Stengel, F. Mohammadi, A., Aebbersold, R., et al. Chemical cross-linking/mass spectrometry maps the amyloid beta peptide binding region on both apolipoprotein E domains [J]. *ACS Chem Biol*, 2015,10(4),1-26.
- [14] Ishmael, F. T., Alley, S. C., Benkovic, S. J. Identification and mapping of protein-protein interactions between gp32 and gp59 by cross-linking [J]. *J Biol Chem* 2001,276(27), 25236-42.
- [15] Leitner, A., Joachimiak, L. A., Unverdorben, P., et al. Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014,11(26),9455-60.
- [16] Back, J. W., de Jong, L., Muijsers, A. O., et al. Chemical Cross-linking and Mass Spectrometry for Protein Structural Modeling [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003,331(2),303-313.
- [17] Sinz, A., Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2006,25(4),663-682.
- [18] Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells [J]. *Nat Methods*, 2005,2(4), 1-7.
- [19] Klykov, O., Steigenberger, B., Pektas, S., et al. Efficient and robust proteome-wide approaches for cross-linking mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2018,13(12),2964-2990.
- [20] Jones, A. X., Cao, Y., Tang, Y. L., et al. Improving mass spectrometry analysis of protein structures with arginine-selective chemical cross-linkers [J]. *Nat Commun*, 2019,1

- 0(1),3911.
- [21] Tayri-Wilk, T., Slavin, M., Zamel, J., et al. Mass spectrometry reveals the chemistry of formaldehyde cross-linking in structured proteins [J]. *Nat Commun*, 2020,11 (1),311-328.
- [22] Rivas, J. D. L., Fontanillo, C. Protein - Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks [J]. *Plos Computational Biology*, 2010,6(6):e1000807.
- [23] March, J. C., Rao, G., Bentley, W. E. Biotechnological applications of green fluorescent protein [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003,62(4):303-315.
- [24] Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan [J]. *Aequorea. Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1962,59(3):223-239.
- [25] Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein [J]. *Gene*,1992,111(2):229-233.
- [26] Chalfie, M., Tu Y., Euskirchen, G., et al. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression [J]. *Science*, 1994,263(5148):802-805
- [27] March J. C., Rao G., Bentley W. E. Biotechnological applications of green fluorescent protein [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003,62(4):303-315.
- [28] Zimmer, M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior [J]. *Chemical Reviews*, 2002,102(3):759-782.
- [29] March, J. C., Rao, G., Bentley, W. E. Biotechnological applications of green fluorescent protein [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003,62(4):303-315.
- [30] Karagozlu, M. Z., Kim, S. Potentiality of Green Fluorescent Protein (GFP) from *Aequorea victoria* - A Mini Review [J]. *Journal of Marine Bioscience and Biotechnology*, 2011,5(4):26-32.
- [31] Tsukamoto, T., Hashiguchi, N., Janicki, S. M., et al. Visualization of gene activity in living cells [J]. *Nature Cell Biology*, 2000,2(12):871-878.
- [32] Ayooob, J. C., Shaner, N. C., Sanger, J. W., et al. Expression of Green or Red Fluorescent Protein (GFP or DsRed) Linked Proteins in Nonmuscle and Muscle Cells [J]. *Molecular biotechnology*, 2001,12(1):65-71.

- [33] Topell S., Glockshuber R. Circular Permutation of the Green Fluorescent Protein [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2002,183:31-48.
- [34] 张俊华,苏振华,王菲,曹雪松.高可溶性绿色荧光蛋白在大肠杆菌中的表达分析[J].*基因组学与应用生物学*,2020,39(08):3496-3504.
- [35] Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., et al. Erratum: Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [J]. *Nature Biotechnology*. 1999,17(12):1227-1227.
- [36] Jakobs, S., Subramaniam, V., Schonle, A. et al. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy [J]. *FEBS letters*, 2000,479(3):131-135.
- [37] Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000,18(8): 532-550.
- [38] Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., et al. A monomeric red fluorescent protein [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002,99(12):7877-7882.
- [39] Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein [J]. *Nature biotechnology*, 2004,22(12):1567-1572.
- [40] Howell, J. M., Winstone, T. L., Coorsen, J. R., et al. An evaluation of in vitro protein-protein interaction techniques: assessing contaminating background proteins [J]. *Proteomics*, 2006,6(7):2050-2069.
- [41] Rappsilber, J. The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes [J]. *Struct. Biol.* 2011,173,530 - 540.
- [42] Chen M., Li W., Zhang Z., et al. Novel near-infrared BiFC systems from a bacterial phytochrome for imaging protein interactions and drug evaluation under physiological conditions [J]. *Biomaterials*, 2015,48:97-107.
- [43] Yin J., Zhu D., Zhang Z., et al. Imaging of mRNA-Protein Interactions in Live Cells Using Novel mCherry Trimolecular Fluorescence Complementation Systems [J]. *Plos One*, 2013,8(11):e80851.
- [44] Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., et al., Interactions among members of the Bcl₂ prot

- ein family analyzed with a yeast two-hybrid system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994,91(20),9238-42.
- [45] Jares,ErijmanE A., Jovin, T M. Imaging molecular interactions in living cells by FRE Tmicroscopy [J]. *Current OpinioninChemical Biology*, 2006,10,409—416.
- [46] Hemaprabha, E. Chemical crosslinking of proteins: A review [J]. *Pharm. Sci. Innov.* 2012,1,22 - 26.
- [47] Panchaud, A., Singh, P., Shaffer S.A. et al. xComb: a cross-linked peptide database a pproach to protein-protein interaction analysis [J], *J. Proteome Res.* 2010,9,2508 - 2515.
- [48] Feixia Chua, Daniel T., Thorntona, Hieu, T. Nguyena.Chemical cross-linking in the str uctural analysis of protein assemblies [J]. *Methods*, 2018,144,53 - 63.
- [49] Rozbesky, D., et al. Impact of chemical cross-linking on protein structure and functio n [J], *Anal.Chem.* 2018,90(2),1104 - 1113.
- [50] Xiaoting Tanga., James, E. Bruce. A new cross-linking strategy: protein interaction rep orter (PIR) technology for protein - protein interaction studies[J]. *Mol. BioSyst.* 2010,6, 939 - 947
- [51] Leitner, A., et al. Crosslinking and mass spectrometry: an integrated technology to un derstand the structure and function of molecular machines [J], *Trends Biochem. Sci.* 2016,41(1),20 - 32.
- [52] Chu F., et al. Unraveling the interface of signal recognition particle and its receptor b y using chemical cross-linking and tandem mass spectrometry [J]. *Proc. Natl. Acad. S ci.* 2004,101,16454 - 16459.
- [53] Schmidt, C., Urlaub, H. Combining cryo-electron microscopy (cryo-EM) and cross-link ing mass spectrometry (CX-MS) for structural elucidation of large protein assemblies [J], *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017,46,157 - 168.
- [54] Singh, P., Panchaud, A., Goodlett, D.R. Chemical cross-linking and mass spectrometry as a low-resolution protein structure determination technique [J]. *Anal. Chem.* 2010,82(7),2636 - 2642.
- [55] Walzthoeni, T., et al. Mass spectrometry supported determination of protein complex s tructure [J], *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2013,23(2),252 - 260.

- [56] David Paramelle, Christine Enjalbal, Muriel Amblard, et al. Solid-Phase Cross-Linking (SPCL): A new tool for protein structure studies [J]. *Proteomics*. 2011,11,1277 - 1286
- [57] Rinner, O., Seebacher, J. Walzthoeni, T., et al. Identification of cross-linked peptides from large sequence databases [J]. *Nat. Methods*. 2008,5,315 - 318.
- [58] Ihling, C., Schmidt, A., Kalkhof, S., et al. Isotope-labeled cross-linkers and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structural analysis of a protein/peptide complex [J]. *Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006,17,1100 - 1113.
- [59] Bing Yang, Yan Jie Wu, Ming Zhu, et al. Identification of cross-linked peptides from complex samples [J]. *Nat. Methods*. 2012,9(9),904 - 906.
- [60] Hoopmann, M.R., et al. Kojak: efficient analysis of chemically cross-linked protein complexes [J]. *Proteome Res.* 2015,14(5),2190 - 2198.
- [61] Krauth, F., Ihling, C.H., Ruttinger, H.H., et al. Heterobifunctional isotope-labeled amine-reactive photo-cross-linker for structural investigation of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight and electrospray ionization LTQ-Orbitrap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009,23,2811 - 2818
- [62] Robinson, P.J., et al. Structure of a complete mediator-RNA polymerase II preinitiation complex [J]. *Cell* 2016,166(6),1411 - 1422.
- [63] Wells, J. A., et al. Cross Bridging Proteins in Nature and their Utilization in biotechnology and Nanotechnology[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006,93,1 - 6.
- [64] In Thermo Scientific Pierce Cross-linking Technical Handbook; <http://www.piercenet.com/>
- [65] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques* [M], Academic Press, London, UK, 2008.
- [66] Wong, D.M., Jameson, S.S. *How to Design and Choose Cross-Linking Reagents, Chemistry of Protein and Nucleic Acid Cross-Linking and Conjugation*, Second edition CRC Press [J]. Place Published, 2011.53 - 80.
- [67] Petrotchenko, E.V., Borchers, C.H. Cross-linking combined with mass spectrometry for structural proteomics [J]. *Mass Spectrom. Rev.* 2010,29,862 - 876.
- [68] Fraenkel-Conrat, H., Cooper, M., and Olcott, H. S. The reaction of formaldehyde with proteins [J]. *Am. Chem. Soc.* 1945,67,950 - 954.
- [69] Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H. S. The reaction of formaldehyde with proteins. V. Cro

- ss-linking between amino and primary amide or guanidyl groups [J]. *Am. Chem. Soc.* 1948,70,2673 - 2684.
- [70] Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H. S. Reaction of formaldehyde with proteins. VI. Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups [J]. *Biol. Chem.* 1998, 174,827 - 843.
- [71] French, D., and Edsall, J. T. The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins [J]. *Adv. Protein Chem.* 1945,2,277 - 335.
- [72] Sutherland, B. W., Toews, J., Kast, J. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions [J]. *Mass Spectrom.* 2008,43,699 - 715.
- [73] Toews, J., Rogalski, J. C., Clark, T. J., and Kast, J. Mass spectrometric identification of formaldehyde-induced peptide modifications under in vivo protein cross-linking conditions [J]. *Anal. Chim. Acta* 2008,618,168 - 183
- [74] Metz, B., Kersten, G. F. A., Hoogerhout, et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides [J]. *Biol. Chem.* 2004,279,6235 - 6243.
- [75] Okuda, K., I. Urabe, Y. Yamada, and H. Okada. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds [J]. *Ferment. Bioeng.* 2011,71:100-105.
- [76] Nimni, M.E., D. Cheung, B. Strates, M. Kodama, and K. Sheikh. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement [J]. *Biomed. Mater. Res.* 1997, 21:741-771.
- [77] Bowes, J.H. and C.W. Cater. The interaction of aldehydes with collagen [J]. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008,168:341-352.
- [78] 韩姝然, 卢磊. 交联酶聚集体的制备及在漆酶固定化中的应用进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(03):164-170.
- [79] Weetall, H.H. Immobilized enzymes: analytical applications [J]. *Anal. Chem.* 2014,46:602A-604A.
- [80] Guisán, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization—stabilization of enzymes [J]. *Enzyme Microb. Technol.* 1998,10:375-382.
- [81] Kulkarni, A.R., Soppimatha, K.S., et al. Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate be

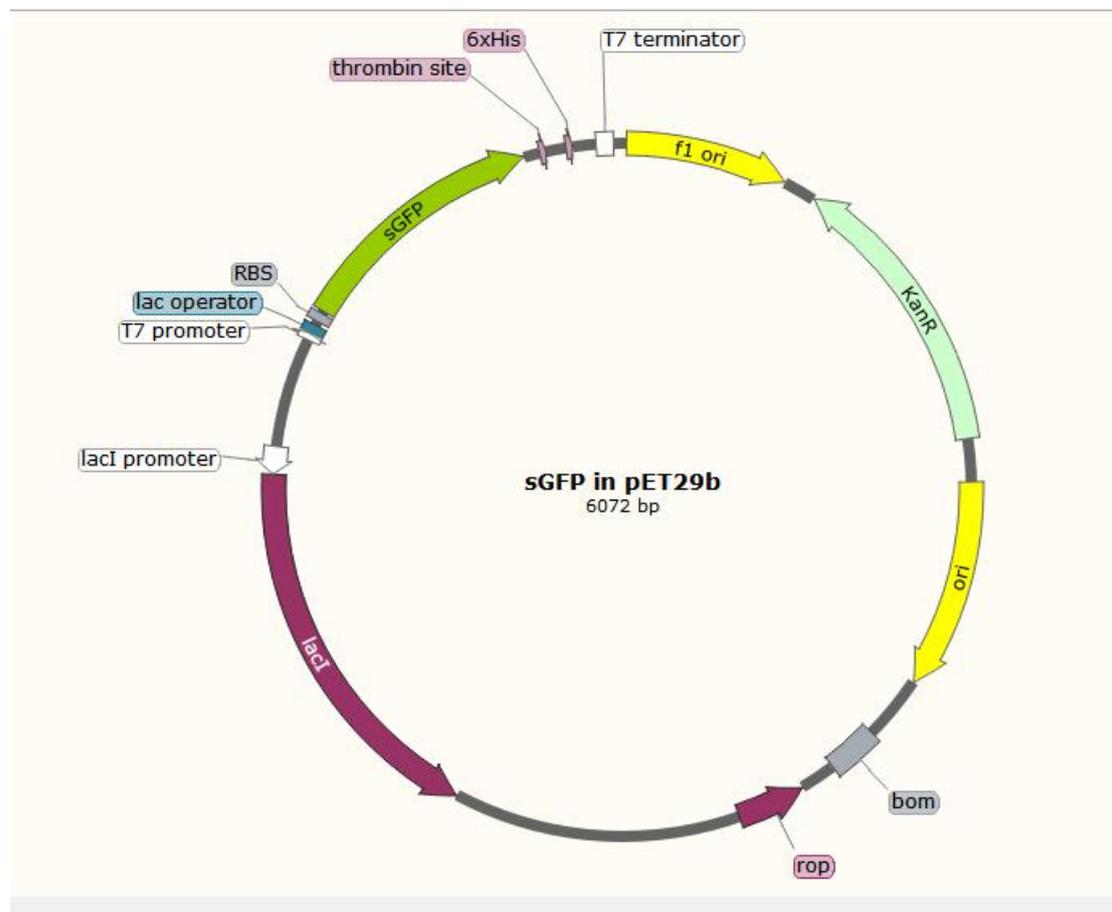
ads containing liquid pesticide for soil application [J]. Control. Release. 2000,97-105.

附录

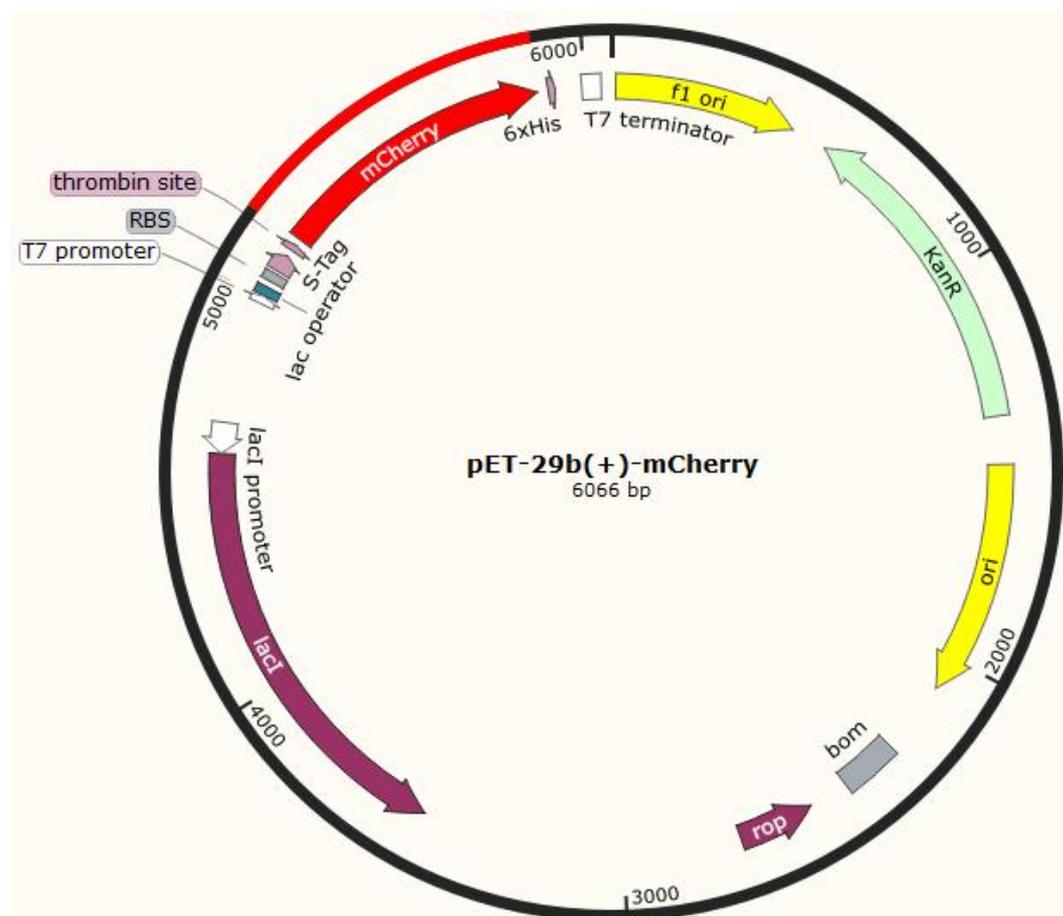
附录 1 缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
cps	counts per second	平均每秒发光计数
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
OD	optical density	光密度
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
LB	Luria-Bertain medium	LB 培养基
rpm	rotational speed in revolutions per minute	转/分钟
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
BPB	bromophenol blue	溴酚蓝

附录 2 pET29(b)-sGFP 质粒图谱



附录 3 pET29(b)-mCherry 质粒图谱



致 谢

光阴似箭，日月如梭。时间像一匹飞驰的骏马，从我们的身边飞逝而去。转眼间，已经到了临近毕业的时候。研究生的三年，自己受益良多，期间所取得的每一点进步都离不开老师的谆谆教诲，同学的热心帮助和家人的默默支持，在此我表达最诚挚的感谢！

首先要感谢的是我的导师曹雪松教授，本研究是在曹雪松老师的精心辅导下顺利完成的。研究生3年生涯，我在曹老师的身上看到了对科研的热爱、认真及执着。曹老师对科研的态度，教育了我只有对科研充满着热爱、敬畏，才会有源源不断的动力，去为科研奉献一切。从研究课题的选择、资料的收集、实验方案的设计到克服实验过程中的难题以及论文的撰写，曹老师耗费了大量心血，他在工作过程中的严谨细致、一丝不苟、循循善诱的指导和不拘一格的思路想法，成为我研究生期间乃至一生的工作学习中的榜样。感谢曹老师，这篇论文的每个实验环节每个数据，都离不开您对我的悉心指导。除此之外，我还要感谢曹老师对我在人生道路上的指导与教诲，对我生活的支持与包容。借此机会，向您表达深深的谢意！

其次感谢赵庆臻老师，感谢您对我蛋白质技术上的倾力教授与帮助，让我可以顺利的开展实验。感谢您在我每一次遇到科研问题时，都在百忙之中依旧耐心细致的对我解疑答惑。感谢王春明老师对我实验和生活的关心与帮助，感谢胡全安、周国利、刘立科等老师，感谢老师们对我学业的关心与指导。

最后感谢2018级所有的同学，感谢大家一直以来的美好相处。感谢我的舍友谢苗、董子健、亓小妮，谢谢你们的温暖陪伴与对我生活及实验的支持与帮助。感谢同实验室与我互勉互励的师姐张俊华、师哥苏振华，师弟滕霄，是你们使我始终拥有一个科研气氛浓厚、学习气氛热烈的环境，同时也感谢你们对我实验的指导与帮助。我更要感谢我的家人和朋友，感谢他们对我生活及学业的全力支持与关心。

临近硕士研究生学业的尾期，在此向所有在不同方面给予我帮助、鼓励与祝福的人表达谢意，谨以此文送上感谢与祝福，祝愿我们每个人的未来璀璨光明！

攻读学位期间发表的学术论文

- [1] 王菲.荧光互补技术在活细胞中研究蛋白质相互作用的应用[J].科学技术创新,2020(10):40-41.
- [2] 王菲,滕霄,曹雪松.体外双分子荧光蛋白检测化学交联剂的研究.化学与生物工程.(已录用).
- [3] 张俊华,苏振华,王菲,曹雪松.高可溶性绿色荧光蛋白在大肠杆菌中的表达分析[J].基因组学与应用生物学,2020,39(08):3496-3504