

分类号 Q816
U D C 57

学校代码 10129
学 号 2022212110058

内蒙古农业大学
硕士学位论文

兔比目鱼肌联蛋白聚合物异源表达条件的优化

Optimization of Rabbit Tropomyosin Polymer

Heterologous Expression Conditions

申请 人： 赵光

学生类别： 全日制专业学位硕士

学位类别： 生物与医药

指导教师： 韩晓东 副教授

熊向华 副研究员

论文提交日期：二〇二四年六月

摘要

肌联蛋白作为骨骼肌纤维中第三类丰富的蛋白质，具有优异的力学性能，展现出了未来应用于生物材料领域的巨大潜力。但目前针对于肌联蛋白相关生物材料的研究中，肌联蛋白聚合物仍存在表达水平低、包涵体比例高、鉴定方法缺乏等问题，限制了肌联蛋白的应用开发。

本实验室前期选取了兔比目鱼肌位置的肌联蛋白中一个具有相对刚性的含有4个Ig结构域的片段（Titin-4Ig），将断裂内含肽gp41-1发挥作用的序列分别拼接到截取片段的N端、C端（Int-Titin-4Ig）。在大肠杆菌中成功表达了Titin-4Ig聚合物，但是该大分子聚合物以包涵体形式表达，且表达量水平较低。另外，目前市场上没有专门针对抗兔肌联蛋白的抗体，通过实验验证商业化的抗人肌联蛋白抗体也不能识别兔肌联蛋白。针对上述问题，本论文开展了抗兔肌联蛋白多抗制备、Titin-4Ig聚合物可溶性表达及优化、Titin-4Ig聚合物纯化及鉴定研究。

1、通过扩增不添加断裂内含肽片段的Titin-4Ig单体基因片段，构建pET22b-Titin-4Ig质粒，转化BL21(DE3)感受态细胞并诱导表达，通过亲和层析纯化得到纯度大于95%的Titin-4Ig蛋白。纯化蛋白与弗氏佐剂等体积混合4次免疫大耳白兔，最终得到效价为1:128000、Western Blot灵敏度达20 ng且特异性良好的抗肌联蛋白兔多抗。

2、通过基因、宿主和表达条件层面对Titin-4Ig聚合物进行了表达优化。基因层面使用冷休克cspA启动子替换T7启动子进行15°C低温诱导表达，结果显示Titin-4Ig聚合物主要以可溶形式表达，但表达水平相对较低；宿主层面采用分子伴侣载体感受态和无细胞表达系统未能实现Titin-4Ig聚合物的表达，而将Int-Titin-4Ig构建至pTIG质粒与硫氧还蛋白（Trx）共表达，结果发现Titin-4Ig聚合物表达水平增加且可溶性表达比例在95%以上，但通过叠加cspA启动子及Trx共表达，Titin-4Ig聚合物表达水平反而下降；在Trx共表达基础上通过正交实验对诱导温度、诱导剂浓度和诱导时间进行优化，最终确定20°C、0.5 mM IPTG和24 h为最佳表达条件。后续为进一步提高Titin-4Ig聚合度，通过BioBrick方式构建了由刚性或柔性接头连接的2个Titin-4Ig蛋白串联表达质粒，结果表明可有效地提升Titin-4Ig聚合物的聚合度。

3、通过亲和层析纯化了Titin-4Ig聚合物。高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）检测结果显示，Titin-4Ig聚合物以四聚体至八聚体为主，最高聚合度可达到十以上，分子量超过600 kDa。利用制备的兔多抗进行Western Blot鉴定，结果表明可特异性显示不同分子量的条带，对应于不同聚合度的Titin-4Ig聚合物。

本论文在实验室前期工作基础上，制备了抗兔肌联蛋白多抗，提高了Titin-4Ig聚合物表达水平和可溶性表达比例，完成了Titin-4Ig聚合物的纯化以及鉴定，为后续蛋白纺丝以及机械性能鉴定研究奠定了基础。

关键词：肌联蛋白；断裂内含肽；多克隆抗体

Optimization of Rabbit Tropomyosin Polymer

Heterologous Expression Conditions

Abstract

Titin, as the third most abundant protein in skeletal muscle fibers, exhibits excellent mechanical properties and demonstrates enormous potential for future applications in the field of biomaterials. However, current research on titin-related biomaterials faces issues such as low expression levels of titin polymers, high inclusion body proportions, and a lack of identification methods, which limit the development and application of titin.

Our laboratory formerly selected a relatively rigid fragment containing 4 Ig domains from the rabbit soleus titin (Titin-4Ig). The sequence that mediates the action of the cleavage-containing peptide gp41-1 was respectively spliced at the N-terminus and C-terminus of the truncated fragment (Int-Titin-4Ig). Titin-4Ig polymer was successfully expressed in *Escherichia coli*, but the large molecular polymer was expressed in the form of inclusion bodies, and the expression level was low. In addition, there are currently no antibodies specifically targeting rabbit titin available on the market, and experiments verify that commercially available anti-human titin antibodies cannot recognize rabbit titin. To address the above issues, this thesis conducts research on the preparation of anti-rabbit titin poly-clonal antibodies, soluble expression and optimization of Titin-4Ig polymer, and purification and identification of Titin-4Ig polymer.

First, the monomeric gene segment of Titin-4Ig, which does not contain fragmented peptide sequences, was amplified to construct the pET22b-Titin-4Ig plasmid. This plasmid was then transformed into BL21 (DE3) competent cells and induced for expression. The Titin-4Ig protein with a purity greater than 95% was obtained through affinity chromatography purification. The purified protein and Freund's adjuvant were mixed in equal volume, and used to immunize big eared white rabbits four times, resulting in the production of a poly-clonal antibody against rabbit titin with a titer of 1:128,000, Western Blot sensitivity of 20 ng, and good specificity.

Next, optimization of the expression of Titin-4Ig polymers was carried out at the gene, host, and expression condition levels. At the gene level, the cold shock *cspA* promoter was used instead of the T7 promoter for expression at 15°C, resulting in mainly soluble expression of Titin-4Ig polymers but at relatively low levels. At the host level, molecular chaperone vector competent cells and cell-free expression systems failed to achieve expression of Titin-4Ig polymers. However, co-expression of Int-Titin-4Ig with the thioredoxin (Trx) protein in the pTIG plasmid led to an increase in the expression level of Titin-4Ig polymers with over 95% soluble expression. At the expression condition level, optimization experiments were conducted on induction temperature, inducer concentration, and induction time based on Trx co-expression, with the best expression conditions determined to be 20°C, 0.5 mM IPTG, and 24 hours. Subsequently, expression plasmid with two Titin-4Ig proteins connected by rigid or flexible linkers were constructed using the BioBrick method, which enhanced the polymerization of Titin-4Ig.

Finally, the Titin-4Ig polymers were purified by affinity chromatography. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis showed that the Titin-4Ig polymers mainly existed as tetramers to octamers, with the highest polymerization degree exceeding 10 and a molecular weight exceeding 600 kDa. Western Blot analysis using the prepared rabbit polyclonal antibodies demonstrated specific banding corresponding to different molecular weights, indicating different polymerization levels of Titin-4Ig polymers.

This study prepared a polyclonal anti-rabbit titin antibody, improved the expression level and solubility of Titin-4Ig polymers, completed the purification and identification of Titin-4Ig polymers, laying a foundation for subsequent studies on protein spinning and mechanical property identification.

Key Words: *Titin;Internal Cleavage Peptide;Polyclonal Antibodies*

Directed by: Associate Prof. HAN Xiaodong

XIONG Xianghua

Applicant for Master degree: ZHAO Guang (Biology and medicine)

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

目 录

1 引言	1
1.1 合成生物学	1
1.1.1 合成生物学概述	1
1.1.2 合成生物学在蛋白基生物材料领域的应用	1
1.2 肌联蛋白	1
1.2.1 肌联蛋白概述	1
1.2.2 微生物合成肌联蛋白	2
1.3 内含肽简介	2
1.3.1 内含肽概述	2
1.3.2 内含肽剪接机制	3
1.4 蛋白质片段连接技术	4
1.5 研究内容	4
1.6 研究意义	5
1.7 技术路线	6
2 材料和方法	7
2.1 实验材料	7
2.1.1 菌株和质粒	7
2.1.2 实验试剂及耗材	7
2.1.3 主要仪器设备	9
2.1.4 培养基及主要试剂配制	9
2.2 实验方法	11
2.2.1 Titin-4Ig 单体的表达及鉴定	11
2.2.2 Titin-4Ig 多克隆抗体的制备	14
2.2.3 Titin-4Ig 聚合物表达及优化	16
2.2.4 Titin-4Ig 聚合物纯化及鉴定	32
3 结果与分析	33
3.1 Titin-4Ig 单体的表达及鉴定	33
3.1.1 p ET22b-Titin-4Ig 表达载体的构建	33
3.1.2 Titin-4Ig 蛋白表达	34
3.1.3 Titin-4Ig 蛋白鉴定	35
3.2 Titin-4Ig 多克隆抗体的制备	35
3.2.1 多克隆抗体制备	35
3.2.2 多克隆抗体鉴定	37
3.3 Titin-4Ig 聚合物表达优化	39

3.3.1 Titin-4Ig 聚合物表达	39
3.3.2 Titin-4Ig 聚合物表达优化	40
3.4 Titin-4Ig 聚合物纯化及鉴定	52
3.4.1 Titin-4Ig 聚合物纯化	52
3.4.2 体积排阻色谱法鉴定(SEC).....	52
3.4.3 Western blot 鉴定.....	53
4 讨论.....	54
5 结论.....	55
参考文献.....	56

插图和附表清单

图1	肌联蛋白结构示意图	2
图2	断裂内含肽剪接示意图	3
图3	肌联蛋白聚合物拼接流程示意图	4
图4	技术路线	6
图5	诱导条件正交实验	26
图6	Biobrick组装Titin-4Ig二倍体示意图	26
图7	Titin-4Ig基因PCR扩增结果	33
图8	Titin-4Ig基因与pET22b-Int-Titin-4Ig载体的酶切结果	33
图9	pET22b-Titin-4Ig质粒鉴定结果	34
图10	Titin-4Ig蛋白单体表达形式电泳图	34
图11	Titin-4Ig蛋白单体Western Blot结果图	35
图12	Titin-4Ig蛋白单体亲和层析纯化电泳结果图	35
图13	Titin-4Ig蛋白Western Blot鉴定	36
图14	蛋白定量标准曲线	36
图15	SEC标准曲线	37
图16	Titin-4Ig蛋白纯度HPLC检测	37
图17	ELISA检测抗Titin-4Ig兔血清的效价	38
图18	抗Titin-4Ig兔血清灵敏度分析	38
图19	抗Titin-4Ig兔血清特异性分析	39
图20	Titin-4Ig聚合物表达	39
图21	pCold II-Int-Titin-4Ig质粒构建	40
图22	pCold II-Int-Titin-4Ig质粒鉴定	40
图23	Titin-4Ig聚合物表达 (cspA)	41
图24	Titin-4Ig聚合物表达 (助溶感受态)	42
图25	pTIG-Int-Titin-4Ig质粒构建	42
图26	pTIG-Int-Titin-4Ig质粒鉴定	43
图27	Titin-4Ig聚合物表达 (Trx)	43
图28	cspA启动子片段PCR电泳图	44
图29	cspA启动子片段与pTIG-Int-Titin-4Ig载体双酶切电泳图	44
图30	pTIG-P _{cspA} -Int-Titin-4Ig质粒鉴定	45
图31	Titin-4Ig聚合物表达 (Trx+cspA)	45
图32	Titin-4Ig聚合物无细胞表达	46
图33	Titin-4Ig聚合物诱导条件优化 (20°C诱导)	46
图34	Titin-4Ig聚合物诱导条件优化 (30°C诱导)	47
图35	Titin-4Ig聚合物诱导条件优化 (37°C诱导)	47
图36	Titin-4Ig聚合物诱导条件优化对比	48
图37	pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig载体构建	48
图38	pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig载体鉴定	49
图39	连接肽Titin-4Ig PCR结果	49
图40	pEASY-FL-Titin-4Ig、pEASY-RL-Titin-4Ig质粒鉴定	50

图41	pTIG-Int-2Titin-4Ig载体构建	50
图42	pTIG-Int-2Titin-4Ig载体双酶切鉴定	51
图43	Int-2Titin-4Ig蛋白表达	51
图44	Titin-4Ig聚合物纯化	52
图45	单体、聚合物和标准品的SEC A280色谱图	52
图46	Titin-4Ig聚合物Western Blot鉴定	53

表1	实验菌株名称	7
表2	实验质粒名称	7
表3	实验试剂耗材表	7
表3	实验试剂耗材表（续）	8
表3	实验试剂耗材表（续）	9
表4	实验仪器表	9
表5	PCR引物设计（pET22b-Titin-4Ig载体构建）	11
表6	PCR扩增体系（pET22b-Titin-4Ig载体构建）	11
表7	PCR扩增条件（pET22b-Titin-4Ig载体构建）	11
表8	双酶切体系（pET22b-Titin-4Ig载体构建）	12
表9	连接体系（pET22b-Titin-4Ig载体构建）	12
表10	菌液PCR鉴定体系（pET22b-Titin-4Ig/DH5 α ）	12
表11	菌液PCR鉴定扩增条件（pET22b-Titin-4Ig/DH5 α ）	13
表12	标准曲线样品制备	15
表13	PCR引物设计（启动子优化）	17
表14	PCR扩增体系（启动子优化）	17
表15	PCR扩增条件（启动子优化）	17
表16	PCR扩增体系（启动子优化）	18
表17	PCR扩增条件（启动子优化）	18
表18	同源重组体系（启动子优化）	18
表19	菌液PCR鉴定体系（启动子优化）	19
表20	菌液PCR鉴定扩增条件（启动子优化）	19
表21	PCR引物设计（Trx）	20
表22	PCR扩增体系（Trx）	20
表23	PCR扩增条件（Trx）	20
表24	双酶切体系（Trx）	21
表25	连接体系（Trx）	21
表26	菌液PCR鉴定体系（Trx）	22
表27	菌液PCR鉴定扩增条件（Trx）	22
表28	PCR引物设计（cspA+Trx）	23
表29	PCR扩增体系（cspA+Trx）	23
表30	PCR扩增条件（cspA+Trx）	23
表31	双酶切体系（cspA+Trx）	23
表32	连接体系（cspA+Trx）	24
表33	菌液PCR鉴定体系（cspA+Trx）	24
表34	菌液PCR鉴定扩增条件（cspA+Trx）	24
表35	无细胞表达体系	25
表36	PCR引物设计（二倍体聚合）	26
表37	PCR扩增体系（pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig）	27
表38	PCR扩增条件（pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig）	27
表39	同源重组体系（pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig）	28

表40	菌液PCR鉴定体系（pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig）	28
表41	菌液PCR鉴定扩增条件（pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig）	28
表42	PCR扩增体系（片段元件）	29
表43	PCR扩增条件（片段元件）	29
表44	菌液PCR鉴定体系（片段元件）	30
表45	菌液PCR鉴定扩增条件（片段元件）	30
表46	双酶切体系（pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig）	30
表47	双酶切体系（pEASY-FL/RL-Titin-4Ig）	31
表48	连接体系（pTIG-Int-2Titin-4Ig）	31
表49	双酶切体系（pTIG-Int-2Titin-4Ig）	31

缩 略 语 表

Titin 4Ig	肌联蛋白结构域
Int-Titin-4Ig (InteinN-Titin 4Ig-InteinC)	肌联蛋白结构域添加内含肽片段
PCR (Polymerase Chain Reaction)	聚合酶链式反应
DNA (DeoxyriboNucleic Acid)	脱氧核糖核酸
EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)	乙二胺四乙酸
Tris (Hydroxymethyl aminomethane)	三羟甲基氨基甲烷
TAE (Tris acetate-EDTA buffer)	Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)	异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷
Amp (Ampicillin)	氨苄青霉素
rpm (Rotation per minute)	每分钟转速
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	高效液相色谱
OD (Optical Density)	光密度值

1 引言

1.1 合成生物学

1.1.1 合成生物学概述

合成生物学作为一门汇集生物学、工程学、信息学等多门学科的新兴交叉学科领域，它在工程学思想的指导下，推动了生物学从模块化、定量化、标准化等角度系统展开，形成了合成生物学特有的研究领域^[1]。合成生物学的概念自从在20世纪70年代被首次提出后^[2]，在21世纪得到了迅速发展，成为了21世纪备受瞩目的生命科学。它的发展不仅推动了人类实现从“认识生命”到“设计生命”的伟大跨越，与传统生物学相比真正做到了从“格物致知”到“建物致用”，同时也为人类解决了在材料^[3]、医药^[4]、食品^[5]、能源^[6~7]、农业^[8]等方面发展面临的众多问题与挑战。

1.1.2 合成生物学在蛋白基生物材料领域的应用

蛋白基生物材料是指以蛋白质为主要成分的生物材料，通常来源于天然蛋白或经过工程改造的蛋白。近年来受到研究者的广泛关注，并开展了大量的研究，例如贻贝蛋白^[9]、蛛丝蛋白^[10]、蚕丝蛋白^[11]、弹性蛋白^[12]、胶原蛋白^[13]等，这一系列以蛋白质为基础的生物材料都是在自然界中逐渐进化出来的。这类材料最为突出的优势在于它们具备良好的生物相容性和可降解性，其中一些还具有良好的机械性能，甚至已经超过许多化学合成的聚合物以及金属合金材料^[14]。此外，许多蛋白基生物材料还具有低毒性以及抗菌性等多种功能特性。随着科学技术的不断进步和创新，人们已经开始挖掘蛋白基生物材料其在可穿戴织物、军事科技、生物医药等多个领域的应用潜力。总的来说，蛋白基生物材料是一类具有多种功能且存在极大研究价值的天然大分子材料。

但是目前天然的蛋白基生物材料的获取相对来说仍然具有一定难度，大多只能通过人工养殖和天然提取方法获得，由于生物体的缓慢生长以及目的产物数量有限，这就意味着需要较长的生产周期，而且难以实现规模化生产，这极大地阻碍了蛋白基生物材料的广泛应用^[15]。因此，人们开始利用工程化微生物合成法来促进这些高性能可再生材料的实际开发和应用。但是由于这些天然蛋白质大多具有高度重复的基因序列以及超高的分子量，这些特性在决定其材料良好机械性能的同时^[16]，也使得这些天然蛋白质在工程微生物中存在表达不稳定、表达量低甚至不表达的问题，而且用于表达的工程化微生物宿主与天然宿主之间密码子的偏好性也存在很大的差异，导致它们在基因表达、代谢、遗传等工程化微生物合成过程中仍然存在诸多障碍，这也限制了蛋白基生物材料的发展和应用。

随着合成生物学的不断发展，以合成生物学的理念作为指导，通过对生命体进行定向迭代的改造和优化，已经可以克服这些限制，实现天然蛋白或其突变体的人工定向合成，目前已经应用于很多研究中。例如，微生物合成的蛛丝蛋白纤维^[17]由于其具有高延展性、高韧性、低密度等优势，已经成为制造防弹装备的优异材料；胶原蛋白具有良好的生物相容性、亲水性、可降解性以及无毒的特性，已经能够利用微生物工厂进行生物制造并成功用于软骨损伤填充、伤口缝线和软组织的植入等领域^[18]；利用人造丝素蛋白和类弹性蛋白等开发组装的新型纳米载体系统^[19]，不仅可以用于核酸、蛋白药物的体内递送^[20]，还可以做到可控释放。相信未来会有更多通过合成生物学方式改造的蛋白基生物材料可以应用到更广阔的领域，发挥更加重要的作用。

1.2 肌联蛋白

1.2.1 肌联蛋白概述

肌联蛋白（Titin）是骨架蛋白的一种，广泛存在于人体的肌肉组织中，尤其在骨

骼肌纤维中含量丰富,它不仅是迄今为止人类发现的分子量最大的蛋白质,其在横纹肌中直径约3~4 nm、长约0.9~1.5 μm ,分子量高达3.7 MDa^[21],也是肌肉中含量排行在第三位的蛋白,占比约为10%^[22]。在结构方面,肌联蛋白由一条超过30,000个氨基酸残基的单一多肽链组成^[23],横跨半个肌节,主要部分为呈串珠样连接的152个免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)样的结构域。肌联蛋白纵向排列于肌节内,由起固定作用且不具扩展性的N端Z盘区、A带区、C端M线区及具有弹性和扩展性的I带区组成^[24]。因为其具有的独特结构特点以及理化性质,在肌肉运动功能中发挥着多种关键作用。除了参与运动过程,肌联蛋白在心血管和消化系统中也扮演着重要角色。它不仅可以帮助心脏肌肉收缩,维持正常的心跳节奏,同时也能促进消化道肌肉的收缩,帮助食物顺利通过。此外,肌联蛋白还具有参与调节血压、维持骨骼的稳定性等功能。因此被广泛应用于生物学研究中^[25~29]。

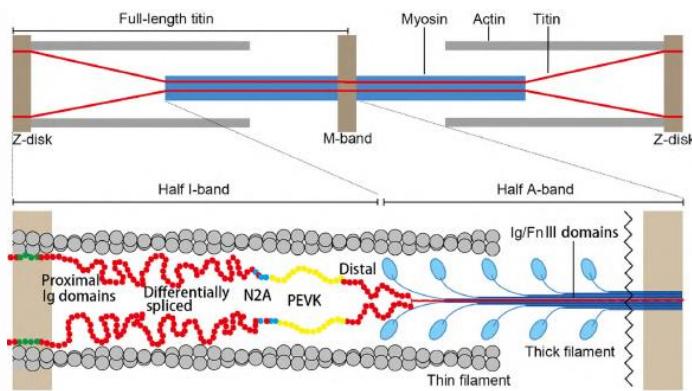


图1 肌联蛋白结构示意图^[30]
Fig.1 Schematic diagram of the Titin structure

1.2.2 微生物合成肌联蛋白

虽然工程化微生物已成功应用于许多天然化合物、生物制品的生产,但是利用微生物直接合成肌联蛋白仍然是一个巨大的挑战。因为它是具有超高分子量的多聚蛋白,其分子量比微生物自身表达最大的蛋白还要大10倍以上。先前的研究中, Lv Shanshan^[31]等利用结构蛋白功能域模块化和嵌段共聚物策略,通过对天然肌联蛋白的功能模块GB1和节肢弹性蛋白的保守重复基序进行重组,成功在微生物中表达了以天然肌联蛋白分子结构为基础的人工弹性蛋白,但这也仅是表达了相对较短的肌联蛋白片段。为了解决这类蛋白表达的技术难题, Zhang Fuzhong^[32]等发明了一种可以在微生物细胞内进行聚合反应的方法,将肌联蛋白的小片段利用内含肽拼接在一起,形成了大约是一般细菌蛋白质50倍大小的超高分子量聚合物,但是这种聚合物大多以包涵体形式表达。

1.3 内含肽简介

1.3.1 内含肽概述

内含肽是存在于前体蛋白质中的一段具有自我催化作用的氨基酸序列,在1990年研究酿酒酵母TFP1基因时被首次发现^[33]。通过后续研究表明,这种插入宿主蛋白序列中的蛋白可以催化自身从宿主蛋白中切除,同时使两侧的宿主蛋白片段通过肽键连接起来形成成熟蛋白质,1994年把这种具有剪接两侧片段能力的蛋白命名为内含肽(Intein),相应的把两端被剪接的宿主蛋白片段命名为外显肽(Extein)^[34]。

迄今为止, 已经发现的天然内含肽高达600多种^[35], 这些内含肽广泛分布在真核生物、细菌和真菌中, 并且在原噬菌体和病毒等宿主中也有发现。内含肽在真核生物以及真细菌中存在数量相对较少, 在细菌中数量最多^[36]。按照天然内含肽的大小对其进行分类, 可以分为小内含肽和大内含肽两种, 其中大内含肽较为常见, 含有的氨基酸残基数较多, 一般为360-380个, 最大的可以达到1,986个氨基酸残基^[37], 都含有核酸内切酶结构域和自剪接结构域^[38]; 而小内含肽含有的氨基酸残基数相对较少, 一般为134-198个^[39], 只含有自剪接结构域^[40]。此外根据天然内含肽的存在形式以及结构特征, 又可以将内含肽分为标准内含肽、微小内含肽和断裂内含肽^[41]三种, 其中断裂内含肽是其中较为特殊的一种。

断裂内含肽 (Split intein) 和另外两种内含肽最大的区别在于, 它其实可以看作是完整内含肽的分裂形式, 多数的断裂内含肽是从序列的内部断裂形成两个一大一小且独立存在于前体蛋白的内含肽片段, 每个片段分别与一个Extein融合^[40]。自从1998年发现了第一个天然断裂型的内含肽^[42]开始, 迄今已有16个天然的断裂型内含肽登记在内含肽数据库Inbase中, 本论文用到的gp41内含肽就是其中剪切效率最高的一种。此外, 人们通过人工改造内含肽合成基因的方法, 构建出了多种非天然的断裂型内含肽^[43~46]。

1.3.2 内含肽剪接机制

内含肽两侧Extein的编码序列以及Intein的编码序列在一起共同构成了一个连续的开放阅读框, 经过翻译后会形成前体蛋白, 在前体蛋白质翻译后成熟过程中, 内含肽进行自我剪接, 利用肽键连接两侧的外显肽形成成熟的蛋白质, 这个过程被称之为内含肽介导的蛋白质剪接。

根据内含肽的N端 (Int^N) 与C端 (Int^C) 片段之间有无共价连接, 可以将内含肽的剪接反应分为顺式剪接以及反式剪接两种^[47]。顺式剪接主要由标准内含肽和微小内含肽介导的蛋白质剪接, 典型的蛋白质顺式剪接包括N-S或N-O酰基重排反应、转酯反应、酰胺氨基酸残基环化反应、S-N或O-N酰基迁移反应这四个基本的亲核反应步骤^[48]。而反式剪接主要是当蛋白质翻译之后, 内含肽Int^N与Int^C就可以相互识别, 并通过非共价键结合, 使其结构正确折叠, 重建活性中心, 形成具有功能的内含肽, 再由此重建的内含肽介导蛋白质的剪接反应, 最后以肽键连接的方式将各自携带的蛋白质外显肽 (E_N、E_C) 连接起来^[49]。内含肽的反式剪接多用于进行蛋白质片段的连接, 包括蛋白多聚物的制备^[50]以及蛋白质的环化等。H Iwai团队^[51]曾使用内含肽PI-PfuI在细菌中拼接制备了一种环状荧光蛋白, 该环状蛋白比之前荧光蛋白的结构更为稳定。

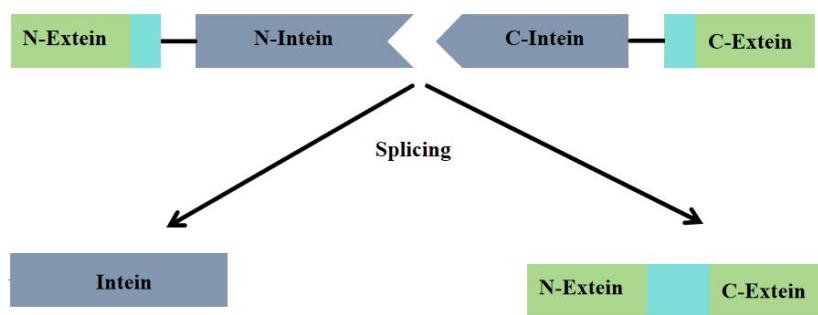


图2 断裂内含肽剪接示意图
Fig.2 Splicing diagram of Split intein

1.4 蛋白质片段连接技术

蛋白质片段连接技术是蛋白质合成中较为重要的一项技术,近年来随着蛋白质片段连接技术的不断发展完善,越来越多的蛋白质片段连接方法被应用于化学、生物学和蛋白质工程的研究中。通过此类技术科研人员能够实现含有特定修饰的多肽片段的连接,在一定程度上扩张了蛋白质样品的获取范围,具有很高的应用价值。

目前应用比较广泛的蛋白质片段连接技术主要有天然化学连接(Native Chemical Ligation, NCL)法和酶连接法。天然化学连接法是在1994年由芝加哥大学的Kent^[52]等提出的,其主要是通过一个多肽片段N端的半胱氨酸残基与自身或另一个多肽片段C端的硫酯基因发生选择性的化学反应,利用所形成的天然酰胺键连接来合成多肽或者蛋白质^[53]。在早期,由于C端硫酯基因的合成稳定性较差,并且NCL连接方法要求在连接位点必须有一个半胱氨酸残基,而半胱氨酸在自然界的丰度又非常低,仅有1.7%左右,这大大限制了该技术的应用。虽然近些年通过原位合成^[54]等策略优化后^[55~56],极大促进了该方法的应用,但是由于NCL反应依靠随机碰撞,通常需要底物浓度达到mmol/L级别,底物浓度会极大影响连接的效率,这也导致一些膜蛋白、脂蛋白等难溶的蛋白片段的连接非常困难。尽管后续有研究者提出了类似向反应体系中加入去垢剂或有机溶剂增加片段溶解性等诸多解决方案,但是这种方法在操作的便捷性、稳定性以及效率方面仍存在一些不足。

酶连接法^[57]也是在蛋白质合成中应用比较广泛的一种方式,与NCL方法相比,它能够在底物浓度较低的情况下进行高效的连接反应。但是此类连接反应通常需要在底物中引入酶特异性识别序列,这些识别序列在反应之后往往是无法完全去除,会残留在蛋白产物的序列中,形成“疤痕”序列。例如Sortase A酶^[58~59]的残留序列LPXTG,就是一个比较典型的情况。尽管研究人员尝试各种方式进行优化,但是目前酶连接法仍然不能实现蛋白质片段完全无痕的连接。

断裂型内含肽介导的反式剪接反应与上述的蛋白质片段连接方式相比,具有很大的优势。因为断裂型内含肽的自剪接过程都是自发的反应,不需要任何化学基团或酶的参与就可以自发完成,过程中也不需要任何活化能^[60]。而且由于断裂型内含肽独特的剪接机制,在进行蛋白片段连接的过程中,基本可以实现不留“疤痕”。正是因为断裂内含肽具有快速、高效、无痕等特点,使得其在蛋白质大分子聚合物制备以及蛋白质环化等领域中极具应用价值^[61]。

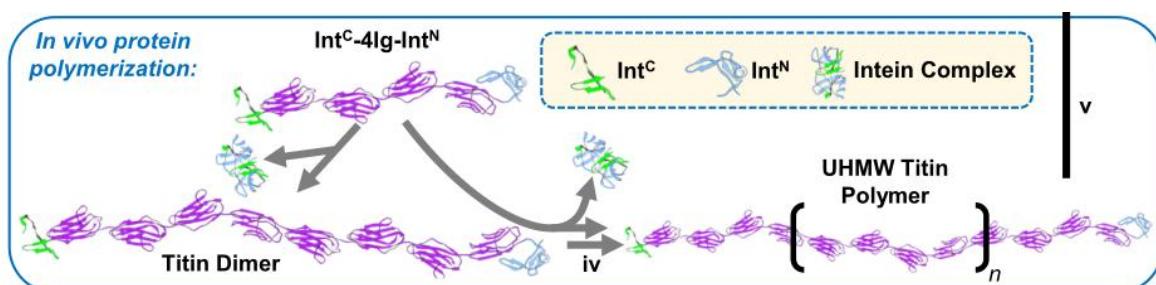


图3 肌联蛋白聚合物拼接流程示意图^[32]
Fig.3 Schematic diagram of the Titin polymer splicing process

1.5 研究内容

本实验室前期已将兔比目鱼肌位置的肌联蛋白中一个相对较短的含有四个Ig结构域的片段与断裂内含肽gp41-1的嵌合片段(Int-Titin-4Ig)连接到pET22b质粒上,成功构建了pET22b-Int-Titin-4Ig重组质粒,并且在大肠杆菌体内初步实现了Titin-4Ig蛋白及其聚合物的有效表达。由于表达的聚合物具有高度的重复序列且分子量相对较大,

这两个特性决定了目的产物作为蛋白基材料的良好性能,但也导致目的蛋白在表达的过程中,容易出现错误折叠、蛋白聚集等问题,从而使目的蛋白聚合物主要以包涵体的形式存在。考虑到包涵体后期处理费时费力,难以满足规模化制备的要求,所以本论文主要针对改善Titin-4Ig蛋白及其聚合物的表达形式、提高聚合度等方面开展研究,同时提高目的蛋白的表达量,并对目的蛋白进行鉴定与纯化:

(1) 为了对Titin-4Ig蛋白及其聚合物进行鉴定,以实验室原有的表达载体pET22b-Int-Titin-4Ig为模板进行PCR扩增以获取目的基因Titin-4Ig的DNA片段,然后通过酶切连接等技术构建重组载体pET22b-Titin-4Ig,表达Titin-4Ig单体,并利用亲和层析纯化,以纯化所得的Titin-4Ig蛋白作为抗原免疫兔制备多克隆抗体,用于后续Titin-4Ig蛋白及其聚合物的鉴定。

(2) 对Titin-4Ig聚合物的表达形式以及表达量进行优化,基因层面的优化是将pET22b质粒更换为pCold II质粒,启动子由原先的T7启动子更换为冷休克启动子cspA;宿主层面优化方式包括采用分子伴侣、硫氧还蛋白(Trx)共表达的方式增加可溶性,并在后期进行质粒的改造,将cspA启动子与Trx共同作用;利用无细胞表达系统进行蛋白的表达;表达条件的优化包括诱导时间、诱导温度和诱导剂浓度,通过正交实验确定最适表达条件。

(3) 提高Titin-4Ig聚合物的聚合度,具体优化方法如下:以实验室现有质粒为模板,通过设计特异性引物在扩增目的基因Titin-4Ig的同时在两端引入同尾酶序列,构建重组载体,然后以pTIG-Int-Titin-4Ig为基础,利用BioBrick技术实现Titin-4Ig片段的逐级拼接,构建pTIG-Int-2Titin-4Ig重组质粒,以此提高聚合物聚合度。

(4) 通过亲和层析的方式对Titin-4Ig单体及聚合物进行纯化;利用两种方式对聚合物进行鉴定:一是通过HPLC的方式,优化HPLC的参数,建立基于蛋白质分子量差异为基础HPLC分离鉴定方法,利用分子量标志物建立保留时间与蛋白质分子量相关关系的SEC标准曲线,以此确定Titin-4Ig聚合物的分子量和聚合度;二是利用制备的靶向Titin-4Ig单体的兔多克隆抗体进行对聚合蛋白进行了Western Blot鉴定。

1.6 研究意义

近些年来,随着科学技术的不断发展,人们对于新材料有了更多更高的要求,例如:绿色环保、更高的力学性能、优异的生物相容性等。目前发现的诸多天然生物材料很好满足了现在对于新材料的要求。类似于肌联蛋白与肌联纤维的大分子蛋白材料越来越受到国内外研究人员的重视,利用微生物工厂生产的策略也成为了天然材料应用发展的新突破口,为新材料的发展注入了更多动力。其中以蛛丝蛋白为代表的研究最具代表性,尽管国内对蛛丝蛋白的结构表征、成丝机理、生产应用等方面的研究取得了一定进展,但是对于肌联蛋白的研究还不够充分。

为此,我们选取了具有优异力学性能的肌联蛋白Ig样结构域作为研究对象,按照合成生物学的理念,引入内含肽进行拼接,实现了这种天然大分子的人工合成,并且利用微生物工厂生产的策略成功表达了拼接的大分子聚合物,通过优化解决包涵体的问题,大大降低了后期蛋白处理的难度,在优化表达形式的同时也提高了蛋白表达量与聚合度,有望使未来的纺丝纤维具有更加优异的力学性能。本论文通过实验室层面的研究解决大分子蛋白质表达的诸多问题,为后续利用微生物工程菌合成天然材料的大规模应用提供理论支持,同时也为人造蛋白功能材料的高效合成提供可借鉴的研究思路。

1.7 技术路线

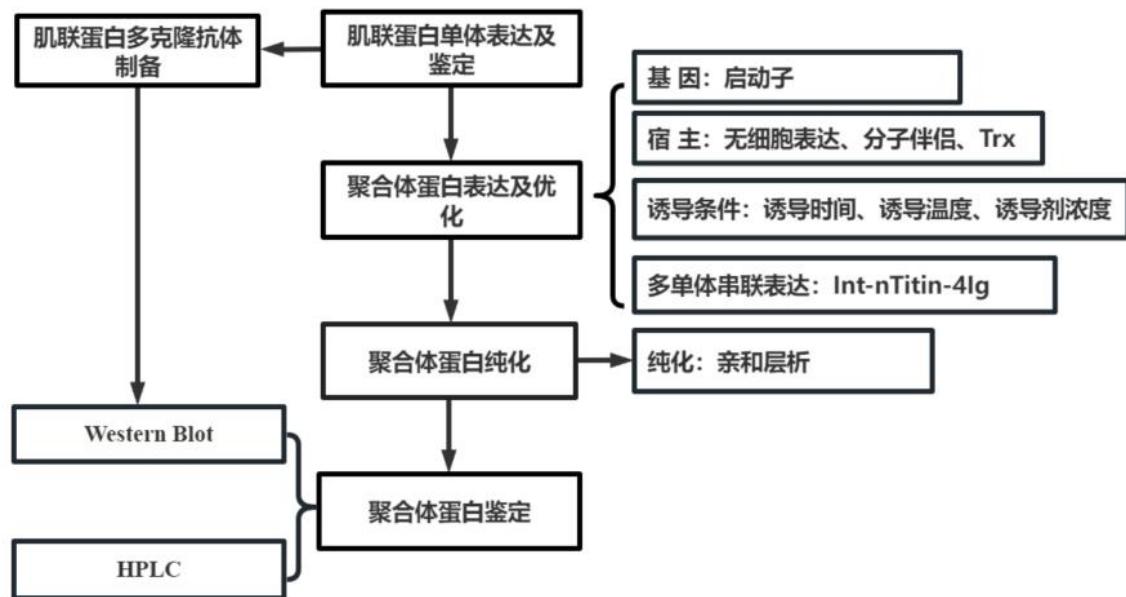


图4 技术路线
Fig.4 Technical route

2 材料和方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株和质粒

(1) 菌株

表1 实验菌株名称

Table.1 Experimental strains names

菌株名称	来源
大肠杆菌DH5 α	北京康为世纪生物技术有限公司
大肠杆菌BL21(DE3)	北京康为世纪生物技术有限公司
RTS BL21(DE3)Chaprone	杭州海基生物科技有限公司

(2) 质粒

表2 实验质粒名称

Table.2 Experimental plasmid names

质粒名称	来源
pET22b	本实验室保存
pET22b-Int-Titin-4Ig	本实验室保存
pET22b-Titin-4Ig	本研究
pCold-Int-Titin-4Ig	本研究
pTIG-Int-Titin-4Ig	本研究
pTIG-P _{cspA} -Int-Titin-4Ig	本研究
pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig	本研究
pTIG-Int-RL-2Titin-4Ig	本研究
pTIG-Int-FL-2Titin-4Ig	本研究

2.1.2 实验试剂及耗材

表3 实验试剂耗材表

Table.3 Experimental reagents table

名称	货号	来源
Q5 High-Fidelity 2×Master Mix	M0492L	NEB
Taq 1×Master Mix	M0491L	NEB
胶回收试剂盒	K0692	赛默飞
质粒小提试剂盒	DP103	天根生化
DNA Marker (2K)	BM101-01	全式金生物
DNA Marker (5K)	BM141	全式金生物
DNA Marker (8K)	BM151-01	全式金生物

表3 实验试剂耗材表 (续)
Table.3 Experimental reagents table (Continue)

名称	货号	来源
Gel Stain核酸染料	GS101	全式金生物
DNA Loading Buffer	GH101	全式金生物
TAE	NA0030	诺唯赞生物
LB肉汤 (干粉)	PM0010	酷来搏科技
LB琼脂 (干粉)	PM0020	酷来搏科技
<i>EcoR</i> I-HF	R3101	NEB
<i>Nde</i> I	R0111S	NEB
<i>Xho</i> I	R0146S	NEB
<i>Kpn</i> I-HF	R3142	NEB
<i>Hind</i> III-HF	R3104V	NEB
<i>Xma</i> I	R0180V	NEB
CutSmart Buffer	B7204	NEB
Quick Ligation Kit	M2200	NEB
Lightening Cloning Kit	BDIT0014	博奥龙
6× Protein Loading Buffer	DL101	全式金生物
SurePAGE™蛋白预制胶 (4-12%)	M00653	金斯瑞生物
HiMark™ Pre-Stained Protein Standard	LC5699	赛默飞
PageRuler™ 预染蛋白分子量标准	26630	赛默飞
硫酸卡那霉素	K8020	索莱宝
氨苄青霉素	A1170	索莱宝
脱脂奶粉	D8340	索莱宝
咪唑	1823673	麦克林生化科技
氯化钠	7647-14-5	大茂化学试剂
HBR-山羊抗兔IgG(H+L)	BF03008X	博奥龙
EDTA	10009617	国药集团
His-Tag Polyclonal Antibody	B1023	博奥龙
TBST速溶颗粒	T7209S	博奥龙
Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder	M00138	金斯瑞生物
eBlot L1 转膜试剂盒 (NC膜)	L00728C	金斯瑞生物
弗氏完全佐剂	F5506	默克生物
弗氏不完全佐剂	F5881	默克生物
BCA Protein Quantification Kit	E112-02	诺唯赞生物
SEC蛋白标准品	69385	默克生物

表3 实验试剂耗材表（续）
Table.3 Experimental reagents table (Continue)

名称	货号	来源
增强型ECL化学发光液I/II	BF06053	博奥龙
甲醇（色谱级）	34860	默克生物
ELASE试剂盒	SE134	索莱宝
Anti-Titin antibody抗体	PA5-100211	赛默飞

2.1.3 主要仪器设备

表4 实验仪器表
Table.4 Table of experimental instruments

仪器名称	型号	来源
热循环仪	T100 Thermal Cycler	美国BIO-RAD公司
低温高速离心机	AvantiJ-25	美国贝克曼库尔特有限公司
常温台式离心机	Microfuge® 20R	美国贝克曼库尔特有限公司
凝胶成像仪	Invitrogen® E-Gel Imager	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
高压灭菌锅	FLS-1000	天美（上海）有限公司
洁净工作台	DL-CJ-1NDII	北京东联哈尔仪器制造有限公司
全温振荡培养箱	HZQ-F160	扬州市培英实验仪器有限公司
电子天平	PRACTUM1102-1CN	赛多利斯科学仪器（北京）有限公司
核酸电泳仪	DYY-3C	北京六一生物科技有限公司
超声破碎仪	VCX750	美国Sonics公司
金属浴	H2O3	金银杏生物科技有限公司
电热恒温水浴锅	DK-98-1	北京长安科学仪器厂
涡旋振荡器	VORTEX-5	江苏其林贝尔仪器制造有限公司
纯水仪	Milli-Q Bioel	美国MILLIPORE公司
凝胶电泳仪	PowerPacBasic	美国BIO-RAD公司
蛋白凝胶考染仪	eStain® L1	金斯瑞生物科技有限公司
高效液相色谱仪	Agilent Infinity 1260	安捷伦科技有限公司
紫外分光光度	WFZUV-2000	尤尼柯（上海）仪器有限公司

2.1.4 培养基及主要试剂配制

(1) 1×TAE 缓冲液

1×TAE 速溶颗粒，购自南京诺唯赞生物科技有限公司，每袋用去离子水稀释定容至 1000 mL。

(2) 1%琼脂糖凝胶

称量 0.3 g 琼脂糖，放入 30 mL 1×TAE 缓冲液，放入微波炉中加热溶解后加 3 μ L Gel Stain 核酸染料。

(3) 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

称取 Tris 碱 12.12 g, 加超纯水 80 mL 溶解, 使用 1 M HCl 缓冲液调节 pH 至 8.0, 定容至 100 mL。

(4) 1 M Tris-HCl (pH 7.4)

称取 Tris 碱 12.12 g, 加超纯水 80 mL 溶解, 用 1 M HCl 缓冲液调 pH 至 7.4, 定容至 100 mL。

(5) 0.5 M EDTA (pH 8.0)

称取 EDTA 粉末 14.612 g, 加入 80 mL 超纯水, 搅拌溶解, 使用 1 M NaOH 调 pH 至 8.0, 定容至 100 mL。

(6) TE 裂解缓冲液 (pH 8.0)

吸取 10 mL 的 1 M Tris-HCl (pH 8.0), 加入 2 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0), 加去离子水定容至 1000 mL, 调节 pH 至 8.0。

(7) 蛋白电泳缓冲液

Tris-MOPS-SDS Running Buffer (干粉), 购自金斯瑞生物科技股份有限公司, 用去离子水搅拌溶解定容至 1000 mL。

(8) TBST 缓冲液

TBST 速溶颗粒, 购自北京兰博利德生物技术有限公司, 用去离子水搅拌溶解定容至 1000 mL。

(9) 5% 脱脂奶粉溶液

称取 1 g 脱脂奶粉溶解于 20 mL 的 TBS 缓冲液中。

(10) 亲和层析纯化 A 液

吸取 20 mL 1 M Tris-HCl (pH 7.4), 分别称取氯化钠 29.22 g, 咪唑 1.36 g, 搅拌溶解定容至 1000 mL。

(11) 亲和层析纯化 B 液

吸取 20 mL 1 M Tris-HCl (pH 7.4), 分别称取氯化钠 29.22 g, 咪唑 34.04 g, 搅拌溶解定容至 1000 mL。

(12) Amp 抗生素储备液 (100 mg/mL)

称取 2.5 g 氨苄青霉素粉末, 用去离子水溶解定容至 25 mL, 使用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装至 1.5 mL EP 管中, 每管 1 mL, 并保存于-20°C 备用。

(13) IPTG 诱导剂 (1 M)

称取 2.38 g IPTG 粉末, 去离子水溶解定容至 10 mL, 使用 0.22 μ M 滤膜过滤除菌, 分装到 1.5 mL EP 管中, 每管 1 mL, 并保存于-20°C 备用。

(14) 200×L-阿拉伯糖 (100 mg/mL)

取 1 g L-阿拉伯糖, 加入至 10 mL 灭菌水中溶解。

(15) Amp-LB 液体培养基

冰上溶解 Amp 抗生素储备液, 取预先配制的 LB 肉汤, 按 1:1000 的比例加适量 Amp 抗生素储备液至 Amp 抗生素终浓度为 100 μ g/mL, 摆晃均匀, 室温保存备用。

(16) Amp-LB 固体平板

冰上溶解 Amp 抗生素储备液, 微波加热溶解预先配制的 LB 琼脂, 待琼脂冷却后按 1:1000 的比例加入 Amp 抗生素储备液至终浓度为 100 μ g/mL, 充分混匀后在超净工作台内倒板, 紫外照射 30 min 后 4°C 保存备用。

(17) 四环素 (2 μ g/mL)

取 0.2 mg 四环素盐酸盐粉末, 加入至 100 mL 灭菌水中溶解。

(18) 氯霉素 (34 mg/mL)

取 340 mg 氯霉素粉末, 加入至 10 mL 乙醇中溶解。

2.2 实验方法

2.2.1 Titin-4Ig单体的表达及鉴定

一、表达载体的构建及鉴定

(1) pET22b-Titin-4Ig表达载体的构建

以实验室前期构建的pET22b-Int-Titin-4Ig质粒为模板,利用PCR技术扩增目的基因Titin-4Ig,通过酶切连接将目的基因连接到pET22b质粒载体上,构建重组表达质粒,命名为pET22b-Titin-4Ig,实验具体流程如下。

根据PCR原理设计引物扩增目的序列,引物序列如下:

表5 PCR引物设计 (pET22b-Titin-4Ig载体构建)

Table.5 PCR primer design (pET22b-Titin-4Ig vector construction)

引物名称	引物序列 (5'-3')
Int-Titin-4Ig-F	CCCATATGGGTACCCACCACCATCAC
Int-Titin-4Ig-R	CCCTCGAGTCCGGATTCCAGAACAGAC

以pET22b-Int-Titin-4Ig质粒载体为模板,组成PCR扩增体系如下:

表6 PCR扩增体系 (pET22b-Titin-4Ig载体构建)

Table.6 PCR amplification system (pET22b-Titin-4Ig vector construction)

反应成分	反应体系
Int-Titin-4Ig-F	1 μ L
Int-Titin-4Ig-R	1 μ L
Q5 High-Fidelity 2 \times Master Mix	25 μ L
pET22b-Int-Titin-4Ig	1 μ L
ddH ₂ O	至 50 μ L

PCR扩增条件如下:

表7 PCR扩增条件 (pET22b-Titin-4Ig载体构建)

Table.7 PCR amplification conditions(pET22b-Titin-4Ig vector construction)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入10 μ L的6 \times DNA Loading Buffer,充分混匀后上样于1%琼脂糖

凝胶中进行电泳分离，凝胶成像分析结果。利用GeneJET Gel Extraction Kit胶回收目的产物，详细步骤见官网说明书：https://www.thermofisher.cn/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.cn/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf。

将pET22b空质粒和胶回收产物分别进行双酶切，双酶切体系如下：

表8 双酶切体系 (pET22b-Titin-4Ig载体构建)
Table.8 Double digestion system(pET22b-Titin-4Ig vector construction)

反应体系组分	质粒	基因
质粒/胶回收产物	8 μ L	16 μ L
无菌水	8 μ L	0 μ L
10×Buffer	2 μ L	2 μ L
<i>Nde</i> I	1 μ L	1 μ L
<i>Xho</i> I	1 μ L	1 μ L
总体积	20 μ L	20 μ L

将样品分别充分混匀，37°C酶切1 h后，向酶切产物中加入4 μ L的6×DNA Loading Buffer，充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离，凝胶成像分析结果，切胶回收目的条带。

利用Quick Ligase Kit对上述两种胶回收产物进行快速连接（25°C连接20 min），连接体系如下：

表9 连接体系 (pET22b-Titin-4Ig载体构建)
Table.9 Connectivity system(pET22b-Titin-4Ig vector construction)

反应成分	反应体系
2×Reaction Buffer	10 μ L
DNA	1 μ L
Vector	3 μ L
Quick Ligase	1 μ L
ddH ₂ O	至20 μ L

(2) 重组表达载体的克隆与鉴定

将上一步得到的连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中，具体详细步骤见官网说明书：https://www.transgen.com/download/pdf/CD201_2024-03-30.pdf。

分别挑取6个单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的大试管中，37°C、200 rpm振荡培养16-18 h，以培养液为模板分别进行菌液PCR鉴定。

配置PCR反应体系：

表10 菌液PCR鉴定体系 (pET22b-Titin-4Ig/DH5 α)
Table.10 PCR identification system of bacterial solution (pET22b-Titin-4Ig/DH5 α)

反应成分	反应体系
------	------

Int-Titin-4Ig-F	1 μ L
Int-Titin-4Ig-R	1 μ L
菌液	1 μ L
1 \times Taq MasterMix	至 25 μ L

PCR扩增条件如下：

表11 菌液PCR鉴定扩增条件 (pET22b-Titin-4Ig/DH5 α)
Table.11 PCR of the bacterial solution to identify the amplification conditions (pET22b-Titin-4Ig/DH5 α)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入5 μ L的6 \times DNA Loading Buffer，充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离，凝胶成像分析结果。将扩增得到预期大小条带的样本送上海生工公司测序。将测序正确的重组质粒命名为pET22b-Titin-4Ig。

利用质粒小提试剂盒进行pET22b-Titin-4Ig质粒的提取，具体详细步骤见官网说明书：https://www.tiangen.com/upload/file/20220826/20220826110706_32314.pdf。

二、Titin-4Ig蛋白原核表达

(1) 表达菌株的筛选

取0.5 μ L构建成功的pET22b-Titin-4Ig质粒化学转化到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中，均匀涂布到Amp-LB固体平板上，37°C倒置培养过夜。具体详细步骤见官网说明书：https://www.transgen.com/download/pdf/CD201_2024-03-30.pdf。

挑取单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的大试管中，37°C、200 rpm振荡培养至对数生长中期 (OD₆₀₀为0.5-1.0) 后，加入终浓度为1 mM的IPTG进行诱导表达，30°C、200 rpm振荡培养过夜。通过收集菌体、超声破碎、取样进行SDS-PAGE电泳分析，具体流程如下：

- ①取1 mL过夜诱导培养的菌液到1.5 mL EP管中，5000 rpm室温下离心5 min收集菌体。
- ②向EP管中加入1 mL的TE裂解缓冲液，利用移液枪吹打混匀直至菌体充分重悬。
- ③将重悬后的菌体置于冰浴中进行超声破碎，超声条件为超声功率35%、超声3 sec、间隔6 sec、超声时间1 min。
- ④取20 μ L超声破碎后的样品，加入4 μ L的6 \times Protein Loading Buffer混匀进行制样，剩余样品12000 rpm室温离心10 min，吸取上清后，使用等体积TE裂解缓冲液重悬沉淀，并按照相同方法进行超声破碎后上清与沉淀样品的制样。

⑤上述样品均沸水浴变性5 min, 进行SDS-PAGE电泳分析, 取20 μ L变性后样品上样于4-12%的蛋白预制胶中, 140 V、电泳时间为65 min。

⑥电泳结束后取出预制胶放入蛋白染色仪中进行染色分析。

(2) Titin-4Ig蛋白鉴定

利用Western Blot方法对目的蛋白进行分析, 具体实验步骤如下:

①制备样品进行SDS-PAGE电泳。

②电泳结束后取出蛋白电泳胶, 截取与胶块大小一致的NC膜, 将NC膜放入平皿中利用1 \times NC膜平衡液润洗约3 min左右。

③将胶块与平衡好的NC膜放入快速湿转仪中, 运行程序完成转膜。

④用TBST缓冲液冲洗NC膜后, 将NC膜置于5%脱脂奶粉溶液中, 脱色摇床上室温孵育1 h, 然后4°C过夜。

⑤先用去离子水冲洗膜。再用TBST缓冲液进行漂洗, 每次漂洗5 min, 重复4次。

⑥按照1:5000的比例加入Anti-Titin antibody抗体, 室温下孵育2 h。

⑦使用TBST缓冲液漂洗NC膜, 每次漂洗5 min, 重复4次。

⑧使用TBST缓冲液按照1:10000的比例加入HBR-山羊抗鼠IgG (H+L) 抗体进行稀释, 室温孵育1 h。

⑨使用TBST缓冲液漂洗NC膜, 每次漂洗5 min, 重复4次。

⑩分别取1 mL增强型ECL化学发光液I和增强型ECL化学发光液II, 混匀后均匀滴加到NC膜上, 避光孵育2 min。

⑪将NC膜放置于化学发光成像系统中显影, 观察结果。

2.2.2 Titin-4Ig多克隆抗体的制备

一、抗原制备

(1) 蛋白纯化

取100 μ L pET22b-Titin-4Ig/BL21(DE3)甘油菌液转接到5 mL Amp-LB液体培养基中, 37°C、200 rpm过夜培养。次日按照1%体积转接至2瓶盛有200 mL Amp-LB液体培养基中, 37°C、200 rpm培养至对数生长期。加入1 M IPTG诱导剂至终浓度1 mM, 30°C、200 rpm振荡培养诱导表达10 h。

将诱导后的菌液于6000 rpm、4°C离心30 min收集菌体。用40 mL亲和层析纯化A液重悬菌体, 置于冰水浴中超声裂解(功率40%、超声3 sec、间隔6 sec、超声30 min)。10000 rpm、4°C离心30 min, 取上清, 用0.22 μ M滤膜过滤。

使用Cytiva HisTrap HP柱进行亲和层析纯化Titin-4Ig蛋白, 使用亲和层析纯化B液连续梯度洗脱(洗脱体积50 mL, 流速2 mL/min), 收集目的洗脱峰, 利用SDS-PAGE电泳分析纯化样品。

(2) 蛋白鉴定

利用纯化所得蛋白进行Western Blot分析, 具体实验步骤见2.2.1, 实验所用一抗为按照1:5000比例稀释的His-tag抗体(小鼠单抗), 二抗为1:10000比例稀释的HBR标记的山羊抗鼠IgG (H+L) 抗体。

(3) 蛋白脱盐

利用PD10脱盐柱进行脱盐处理, 具体实验步骤如下:

①脱盐柱的预处理：取下脱盐柱顶部的盖子并倒出柱子里的储存液体，剪开柱子底部槽口处。

②脱盐柱的平衡：加入3 mL PBS平衡缓冲液填满脱盐柱并让缓冲液完全进入柱床内，丢弃流出液，重复4次。

③样品上样：加入2.5 mL纯化后的蛋白样品，使样品完全进入柱床内，丢弃流出液。

④样品收集：将样品收集管置于脱盐柱底部，加入3.5 mL的PBS缓冲液并收集洗脱液。

⑤脱盐柱的保存：向脱盐柱中加入3.5 mL的纯水冲洗脱盐柱，重复3次，再加3.5 mL的20%乙醇冲洗一遍，然后加入3 mL 20%乙醇，封住脱盐柱顶部以及底部保存。

(4) 蛋白定量

利用BCA蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行测定，具体实验步骤如下：

①BCA工作液配制：根据样品数量，按体积比50:1 (BCA Reagent A:BCA Reagent B) 配制适量BCA工作液，充分混匀。

②标准曲线绘制：取酶标板，按下表加入相应试剂；

表12 标准曲线样品制备
Table.12 Standard curve sample preparation

孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
标准蛋白 (μL)	0	1	2	4	8	12	16	20
ddH ₂ O (μL)	20	16	18	16	12	8	4	0
BCA工作液 (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200
蛋白含量 (μg)	0	1	2	4	8	12	16	20

③样品准备：将待测蛋白样品用去离子水适当稀释后，取20 μL样品，加入200 μL BCA工作液。

④振荡混匀后，37°C放置30 min。

⑤使用酶标仪测定A562 nm处的吸光值，以不含标准蛋白孔的吸光值为空白对照。

⑥以蛋白含量为纵坐标，测得的吸光值为横坐标，绘制标准曲线。

⑦根据测得的吸光值，在标准曲线上计算出稀释样品的蛋白浓度，然后根据样品的稀释倍数计算蛋白的实际浓度。

(5) 蛋白纯度检测

利用HPLC进行目的蛋白纯度的检测，具体实验步骤如下：

①准备：检查仪器设备，对所需样品以及流动相溶液，通过超声去除气泡，过滤去除杂质，防止色谱柱堵塞。

②色谱柱平衡：处理完毕后，用3倍柱体积的高有机相冲洗色谱柱，接着用5倍柱体积的流动相 (200 mmol/L NaCl和20 mmol/L PBS、pH为7.0) 冲洗色谱柱。

③上样：平衡完毕后进行上样，流速0.5 mL/min，上样体积为100 μL。

④洗脱：上样结束后，用1倍柱体积的流动相进行洗脱。

⑤清洗与保存：洗脱结束后用20%甲醇溶液冲洗5倍柱体积，接着用90%甲醇溶液冲洗5倍柱体积，完成后拆卸色谱柱，两端密封保存。

二、动物免疫

选取2只健康符合实验动物标准的大耳白兔（雌性、十二周龄），静养一周以适应环境，在免疫前采血作为阴性对照。

用注射器从耳静脉抽取约5 mL血液，37°C灭活30 min，然后放置于4 °C冰箱过夜使血液凝结释放血清，4000 rpm离心10 min，上清即为血清，收集血清并分装，于-20°C冰箱保存。

将准备好的抗原与等体积的佐剂（初次免疫使用弗氏完全佐剂，加强免疫使用弗氏不完全佐剂）混合乳化，制备免疫原。经背部皮下两点、大腿肌肉两点等多点注射，初次免疫（第0天）与最后加强免疫（第42天）蛋白量为每只每次500 μ g，第二次（第14天）、第三次（第28天）加强免疫蛋白量为每只每次300 μ g，在最后加强免疫后7天采血进行效价的测定，合格后进行放血并分离血清保存。

三、多克隆抗体鉴定

（1）效价测定

采用间接ELISA法对多克隆抗体的效价进行测定，使用包被缓冲液将纯化Titin-4Ig蛋白样品稀释至1 μ g/mL，100 μ L/孔包被96孔酶标板，封口膜封口后4°C包被过夜；弃包被液，用洗涤缓冲液洗板3次，每孔中加入200 μ L封闭液，37°C下封闭2 h，再用洗涤缓冲液洗板3次；按照1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000、1:512000梯度稀释待测血清，将免疫前取的血清作为阴性对照进行同样的稀释，每孔加入100 μ L，以上各组分别同时设立3组平行样本，37°C温育1 h，用洗涤缓冲液洗板3次；每孔加入100 μ L HRP标记的山羊抗兔IgG稀释液（1:10000），37°C温育反应1 h，用洗涤缓冲液洗板3次；每孔中加入100 μ L TMB，室温避光孵育5 min，再加入50 μ L的终止液终止反应；用酶标仪读取各样品450 nm处吸光值（A）后，扣除空白后分别计算同一稀释倍数的抗血清与阴性血清A的比值（Cutoff），Cutoff>2.1时所测血清的最大稀释倍数即为抗体效价。

（2）灵敏度检测

采用Western Blot的方法对多克隆抗体的灵敏度进行测定，选用纯化后的Titin-4Ig蛋白，分别按照1 ng、10 ng、20 ng、50 ng、80 ng、100 ng、200 ng、500 ng、1 μ g蛋白量进行上样，然后使用制备好的抗血清稀释液作为一抗（1:30000）、HRP标记的山羊抗兔IgG稀释液（1:10000）作为二抗进行Western Blot分析，具体实验步骤同2.2.1。

（3）特异性分析

使用制备好的抗血清稀释液作为一抗（1:30000）、HRP标记的山羊抗兔IgG稀释液（1:10000）作为二抗，对pET22b-Titin-4Ig重组菌株诱导表达的全菌样品及纯化后的样品进行Western Blot分析，具体实验步骤同2.2.1。

2.2.3 Titin-4Ig聚合物表达及优化

一、Titin-4Ig聚合物表达

取100 μ L pET22b-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)甘油菌液转接到5 mL Amp-LB液体培养基中，37°C、200 rpm过夜培养。次日按照1%体积转接至2瓶盛有200 mL Amp-LB液体培养基中，37°C、200 rpm培养至对数生长期。加入1 M IPTG诱导剂至终浓度1 mM，

30°C、200 rpm振荡培养诱导表达10 h。离心收集菌体，超声破碎后按照2.2.1中方法进行SDS-PAGE凝胶电泳分析。

二、Titin-4Ig聚合物表达优化

(1) 启动子优化

以前期构建的pET22b-Int-Titin-4Ig质粒为模板，利用PCR技术扩增目的基因Int-Titin-4Ig，通过同源重组将目的基因连接到pCold II质粒载体上，构建重组表达质粒。实验具体流程如下。

根据同源重组原理设计特异性引物扩增目的片段，引物序列如下：

表13 PCR引物设计（启动子优化）
Table.13 PCR primer design (Promoter optimization)

引物名称	引物序列（5'-3'）
InN-F	CATCATCATCATATGATGGCTAAGACTAAAATGCTGAAAAAAATTCTGAA G
InN-R	TTCGGATCCCTCGAGCTCGAGTTATTCTTCACGTACAGGC
pCold-F	CTCGAGGGATCCGAATTCAAGC
pCold-R	CATATGATGATGATGATGATGCACTTGTG

以pET22b-Int-Titin-4Ig质粒载体为模板，组成PCR反应体系：

表14 PCR扩增体系（启动子优化）
Table.14 PCR amplification system (Promoter optimization)

反应成分	反应体系
InN-F	1 μL
InN-R	1 μL
Q5 High-Fidelity 2× Master Mix	25 μL
pET22b-Int-Titin-4Ig	1 μL
ddH ₂ O	至 50 μL

PCR扩增条件如下：

表15 PCR扩增条件（启动子优化）
Table.15 PCR amplification conditions (Promoter optimization)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34

延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

以pCold II载体质粒为模板，线性化处理载体，配置PCR反应体系：

表16 PCR扩增体系（启动子优化）
Table.16 PCR amplification system (Promoter optimization)

反应成分	反应体系
pCold-F	1 μL
pCold-R	1 μL
Q5 High-Fidelity 2×Master Mix	25 μL
pCold II	1 μL
ddH ₂ O	至 50 μL

PCR扩增条件如下：

表17 PCR扩增条件（启动子优化）
Table.17 PCR amplification conditions (Promoter optimization)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入10 μL的6×DNA Loading Buffer，充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离，凝胶成像分析结果。利用GeneJET Gel Extraction Kit胶回收目的条带。产物胶回收后，按照下表建立同源重组体系：

表18 同源重组体系（启动子优化）
Table.18 Homologous recombination system (Promoter optimization)

反应成分	反应体系
DNA	1 μL
Vector	4 μL
2×Lightening Cloning Master Mix	5 μL
ddH ₂ O	至10 μL

在50°C水浴锅内放置40 min, 完成后置于冰上进行下一步转化试验, 转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。

分别挑取5个单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的大试管中, 37°C、200 rpm振荡培养16-18 h, 以培养液为模板分别进行菌液PCR鉴定。

表19 菌液PCR鉴定体系（启动子优化）

Table.19 PCR identification system of bacterial solution (Promoter optimization)

反应成分	反应体系
InN-F	1 μ L
InN-R	1 μ L
菌液	1 μ L
1 \times Taq Master Mix	至 25 μ L

PCR扩增条件如下:

表20 菌液PCR鉴定扩增条件（启动子优化）

Table.20 PCR of the bacterial solution to identify the amplification conditions (Promoter optimization)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入5 μ L的6 \times DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果。将扩增得到预期大小条带的样本送上海生工公司测序。将测序正确的重组质粒命名为pCold II-Int-Titin-4Ig, 利用质粒小提试剂盒进行质粒的提取。

取0.5 μ L构建成功的pCold II-Int-Titin-4Ig质粒化学转化到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中, 均匀涂布到Amp-LB固体平板上, 37°C倒置培养直至出现单克隆。分别挑取3个单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的试管中, 37°C、200 rpm振荡培养至对数生长中期(OD₆₀₀为0.5-1.0)后, 加入终浓度为1 mM的IPTG进行诱导表达, 15°C、200 rpm振荡培养24 h。通过收集菌体、超声破碎、制样进行SDS-PAGE电泳分析。

(2) 分子伴侣—转化助溶表达感受态宿主

将pET22b-Int-Titin-4Ig质粒转入RTS BL21(DE3)Chaprone助溶表达感受态细胞中, 通过诱导表达感受态细胞中pG-KJE8质粒上携带的5种分子伴侣蛋白质, 促进肌联蛋白聚合物的可溶性表达, 具体实验步骤如下:

从-20°C冰箱中取出Nano E.coli Transfection Reagent放置于冰上融化，取300 μL该样液加入到一支冻干感受态细胞中，按每支30 μL分装后，取一支置于冰上进行下一步操作，剩余-80°C冰箱保存。

取0.5 μL pET22b-Int-Titin-4Ig质粒转化至RTS BL21(DE3)Chaprone感受态细胞中，取200 μL复苏菌液涂布到含相应抗生素的LB平板上（含50 μg/mL Amp和20 μg/mL Cm）。37°C倒置培养16-18 h，直至有单菌落出现。挑取单克隆菌落至装有5 mL LB液体培养基（含50 μg/mL Amp和20 μg/mL Cm）的试管中，37°C、200 rpm振荡培养过夜。

按照1/50体积比例接入新配制的LB液体培养基（含50 μg/mL Amp和20 μg/mL Cm、0.5 μg/mL L-阿拉伯糖）37°C、200 rpm振荡培养至菌体密度OD₆₀₀约0.3（约2 h）后加入终浓度为2 ng/mL TE诱导Chaprone伴侣蛋白表达，继续振荡培养菌体密度至OD₆₀₀约0.5（约4 h）。加入IPTG至终浓度为1 mM，20°C、200 rpm振荡培养24 h。通过收集菌体、超声破碎、制样进行SDS-PAGE电泳分析。

（3）分子伴侣—硫氧还蛋白（Trx）共表达

通过构建硫氧还蛋白（Thioredoxin, Trx）与Int-Titin-4Ig共表达质粒来促进对Titin-4Ig聚合物可溶性表达以及表达量的优化。具体实验步骤如下：

根据PCR原理设计引物扩增目的序列，引物序列如下：

表21 PCR引物设计（Trx）
Table.21 PCR primer design (Trx)

引物名称	引物序列（5'-3'）
pTIG-F	CCGGAATTCTAATGGCTAACGACTAAAATGCTGAAAAAAATTCTGAAG
pTIG-R	GGCTCGAGTTCTTCACGTACAGGCACATACCT

以pET22b-Int-Titin-4Ig质粒载体为模板，组成PCR扩增体系如下：

表22 PCR扩增体系（Trx）
Table.22 PCR amplification system (Trx)

反应成分	反应体系
pTIG-F	1 μL
pTIG-R	1 μL
Q5 High-Fidelity 2×Master Mix	25 μL
pET22b-Int-Titin-4Ig	1 μL
ddH ₂ O	至 50 μL

PCR扩增条件如下：

表23 PCR扩增条件（Trx）
Table.23 PCR amplification conditions (Trx)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min

变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入10 μL的6×DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果。利用GeneJET Gel Extraction Kit胶回收目的产物。

将pTIG空质粒与胶回收产物分别进行双酶切, 双酶切体系如下:

表24 双酶切体系 (Trx)
Table.24 Double digestion system (Trx)

反应体系组分	质粒	基因
质粒/胶回收产物	8 μL	16 μL
ddH ₂ O	8 μL	0 μL
10×Buffer	2 μL	2 μL
<i>EcoR</i> I	1 μL	1 μL
<i>Xho</i> I	1 μL	1 μL
总体积	20 μL	20 μL

将样品分别充分混匀, 37°C酶切1 h后, 向酶切产物中加入4 μL的6×DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果。切胶回收目的条带。

利用Quick Ligase Kit对上述两种胶回收产物进行快速连接(25°C连接20 min), 连接体系如下:

表25 连接体系 (Trx)
Table.25 Connectivity system (Trx)

反应成分	反应体系
2×Reaction Buffer	10 μL
DNA	1 μL
Vector	3 μL
Quick Ligase	1 μL
ddH ₂ O	至20 μL

将上一步得到的连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中, 分别挑取5个单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的大试管中, 37°C、200 rpm振荡培养16-18h,

以培养液为模板分别进行菌液PCR鉴定。

配置PCR反应体系：

表26 菌液PCR鉴定体系 (Trx)
Table.26 PCR identification system of bacterial solution (Trx)

反应成分	反应体系
pTIG-F	1 μ L
pTIG-R	1 μ L
菌液	1 μ L
1 \times Taq Master Mix	至 25 μ L

PCR扩增条件如下：

表27 菌液PCR鉴定扩增条件 (Trx)
Table.27 PCR of the bacterial solution to identify the amplification conditions (Trx)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入5 μ L的6 \times DNA Loading Buffer，充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离，凝胶成像分析结果。将扩增得到预期大小条带的样本送上海生工公司测序。将测序正确的重组质粒命名为pTIG-Int-Titin-4Ig，利用质粒小提试剂盒进行质粒的提取。

取0.5 μ L pTIG-Int-Titin-4Ig质粒化学转化大肠杆菌至BL21(DE3)感受态细胞中，均匀涂布到Amp-LB固体平板上，37°C倒置培养直至出现单克隆。分别挑取3个单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的试管中，37°C、200 rpm振荡培养至对数生长中期(OD₆₀₀为0.5-1.0)后，加入终浓度为1 mM的IPTG进行诱导表达，20°C、200 rpm振荡培养24 h。通过收集菌体、超声破碎、制样进行SDS-PAGE电泳分析。

(4) 组合优化：使用cspA启动子及硫氧还蛋白Trx共表达

鉴于使用pCold II质粒上的冷休克启动子cspA、以及调控硫氧还蛋白基因与目的蛋白基因共表达两种方式在改善Titin-4Ig聚合物表达形式和表达量上具有显著的效果，所以我们用cspA启动子替换掉pTIG-Int-Titin-4Ig上的T7启动子，验证是否会有叠加的效果。具体实验步骤如下：

根据PCR原理设计引物扩增目的序列，引物序列如下：

表28 PCR引物设计 (cspA+Trx)
Table.28 PCR primer design (cspA+Trx)

引物	引物序列 (5'-3')
PcspA-F	GGAAGATCTTAGGTTGAGGCCGTTGAGCAC
PcspA-R	CGCCATATGGGTGTATTACCTCTTAATAATTAAGTGTGCCT

配置PCR反应体系:

表29 PCR扩增体系 (cspA+Trx)
Table.29 PCR amplification system (cspA+Trx)

反应成分	反应体系
PcspA-F	1 μ L
PcspA-R	1 μ L
Q5 High-Fidelity 2× Master Mix	25 μ L
pET22b-Int-Titin-4Ig	1 μ L
ddH ₂ O	至 50 μ L

PCR扩增条件如下:

表30 PCR扩增条件 (cspA+Trx)
Table.30 PCR amplification conditions (cspA+Trx)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入10 μ L的6×DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果, 利用GeneJET Gel Extraction Kit胶回收目的产物。

将pTIG-Int-Titin-4Ig质粒和胶回收产物分别进行双酶切, 双酶切体系如下:

表31 双酶切体系 (cspA+Trx)
Table.31 Double digestion system (cspA+Trx)

反应体系组分	质粒	基因
质粒/胶回收产物	8 μ L	16 μ L
ddH ₂ O	8 μ L	0 μ L
10× Buffer	2 μ L	2 μ L

<i>Bgl</i> II	1 μ L	1 μ L
<i>Nde</i> I	1 μ L	1 μ L
总体积	20 μ L	20 μ L

将样品分别充分混匀, 37°C酶切1 h后, 向酶切产物中加入4 μ L的6×DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果。切胶回收目的条带。

利用Quick Ligase Kit对上述两种胶回收产物进行快速连接(25°C连接20 min), 连接体系如下:

表32 连接体系 (cspA+Trx)
Table.32 Connectivity system (cspA+Trx)

反应成分	反应体系
2 × Reaction Buffer	10 μ L
pTIG-IntN-Titin-IntC酶切片段	3 μ L
PcspA酶切片段	1 μ L
Quick Ligase	1 μ L
ddH ₂ O	至 20 μ L

将上一步得到的连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中, 分别挑取10个单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的大试管中, 37°C、200 rpm振荡培养16-18h, 以培养液为模板分别进行菌液PCR鉴定。

配置PCR反应体系:

表33 菌液PCR鉴定体系 (cspA+Trx)
Table.33 PCR identification system of bacterial solution (cspA+Trx)

反应成分	反应体系
PcspA-F	1 μ L
PcspA-R	1 μ L
菌液	1 μ L
1 × Taq Master Mix	至 25 μ L

PCR扩增条件如下:

表34 菌液PCR鉴定扩增条件 (cspA+Trx)
Table.34 PCR of the bacterial solution to identify the amplification conditions (cspA+Trx)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec

延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入5 μL的6×DNA Loading Buffer，充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离，凝胶成像分析结果。将扩增得到预期大小条带的样本送上海生工公司测序。将测序正确的重组质粒命名为pTIG-P_{cspA}-Int-Titin-4Ig，利用质粒小提试剂盒进行质粒的提取。

取0.5 μL构建成功的pTIG-P_{cspA}-Int-Titin-4Ig质粒化学转化到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中，均匀涂布到Amp-LB固体平板上，37°C倒置培养直至出现单克隆。分别挑取3个单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的试管中，37°C、200 rpm振荡培养至对数生长中期（OD₆₀₀为0.5-1.0）后，加入终浓度为1 mM的IPTG进行诱导表达，15°C、200 rpm振荡培养24 h。通过收集菌体、超声破碎、取样进行SDS-PAGE电泳分析。

（5）无细胞表达系统

从上述优化方式中挑选出表达量水平较高的两种，将质粒加入无细胞表达系统中进行Titin-4Ig聚合物表达，具体实验步骤如下：

将所需用到的试剂放在冰上静置至完全融化，设置5组实验组，分别为阳性对照（pJL1-GFP质粒）、空白对照、pET22b质粒、pET22b-Int-Titin-4Ig质粒、pTIG-Int-Titin-4Ig质粒、并且按照下表建立反应体系。

表35 无细胞表达体系
Table.35 Cell-free expression system

试剂	体积
组分A	20 μL
组分B	17 μL
DNA模板	1 μg
ddH ₂ O	补至50 μL
总反应体积	50 μL

将混合好的反应液置于摇床中25°C，180 rpm反应16 h，4°C、10000 g离心2 min后，取1 μL上清进行制样，利用SDS-PAGE电泳分析目的产物的表达情况。

（6）诱导条件优化

对Titin-4Ig聚合物表达的条件包括诱导温度、诱导时间、诱导剂浓度等进行摸索，确认最佳诱导参数，具体实验步骤如下：

取100 μL pTIG-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)甘油菌液转接到5 mL Amp-LB液体培养基中，37°C、200 rpm过夜培养。次日按照1%体积转接至2瓶盛有200 mL Amp-LB液体培养基的三角瓶中，37°C、200 rpm培养至对数生长期。按照每管5 mL菌液分装48份。分别设置20°C、30°C、37°C 3个温度梯度，0.1 mM、0.2 mM、0.5 mM、1.0 mM 4

个诱导剂浓度, 4 h、12 h、24 h、36 h 4个诱导时长, 按照下表进行正交实验。通过收集菌体、超声破碎、取样进行SDS-PAGE电泳分析。

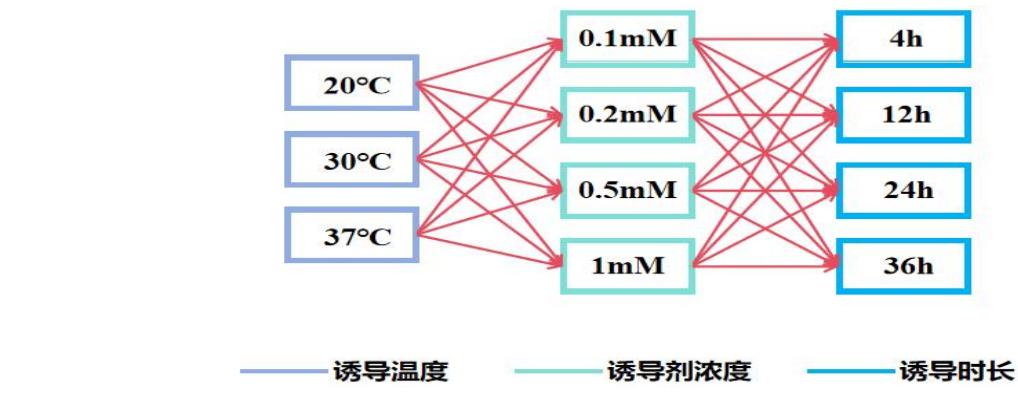


图5 诱导条件正交实验
Fig.5 Induction conditioned orthogonal experiments

(7) Titin-4Ig二倍体聚合

为进一步提高Titin-4Ig蛋白聚合度, 在上述优化效果最好的pTIG-Int-Titin-4Ig质粒基础上构建Titin-4Ig二倍体表达质粒。首先在Titin-IntC之间引入一对同尾酶Age I与Xma I, 构建pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig质粒; 然后在Titin-4Ig单体前加上连接肽构建Titin-4Ig多倍体构建所需的单体元件, 连接肽分为柔性(Flexible Linker,(EAAAK)₃)和刚性(Rigid Linker,(GGGGS)₃)两种; 最后通过酶切连接的方式构建Titin-4Ig二倍体表达质粒pTIG-Int-FL-2Titin-4Ig和pTIG-Int-RL-2Titin-4Ig, 转入大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达, 验证2Titin-4Ig蛋白聚合效果。具体流程如图6所示:

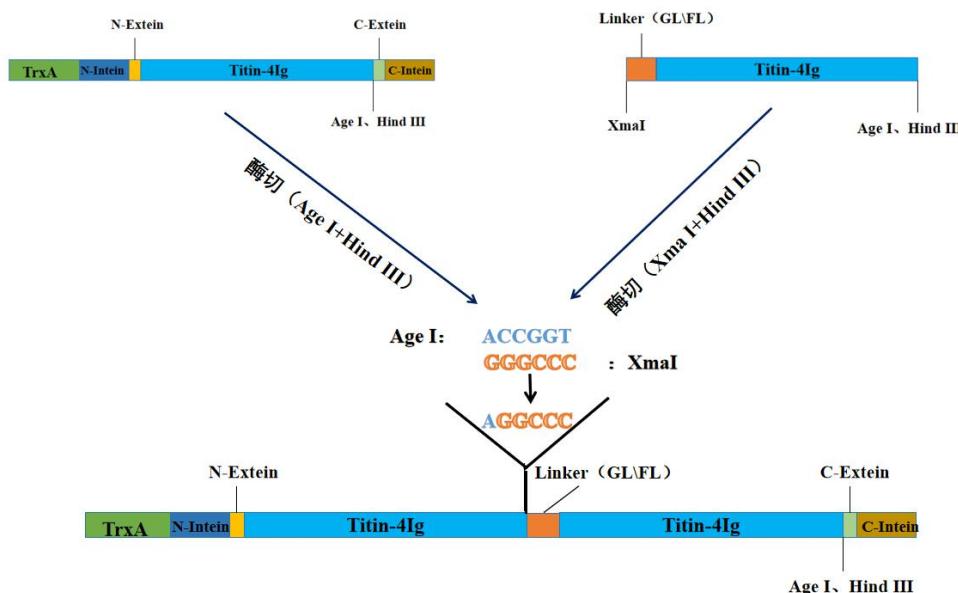


图6 Biobrick组装Titin-4Ig二倍体示意图

Fig.5 Schematic diagram of Biobrick assembly of Titin-4Ig diploids

根据PCR原理设计引物扩增目的序列, 引物序列如下:

表36 PCR引物设计 (二倍体聚合)
Table.36 PCR primer design(Diploid polymerization)

引物	引物序列 (5'-3')
----	--------------

片段1-F	ACGACATCCTGACCCACAACCTCTTAGCGATGTTGGTACC
片段1-R	CCCAAGCTTGGGACCGGTTCCGGATTCCAGAACAGACAGG
片段2-F	ACCGGTCCCAAGCTTACCGTTCTGGTTACTGTCTG
片段2-R	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGTTCTTCACGTACAGGC
FL-Titin-F	ATCAACTTACCCGGGGGTGGTGGTGGATCCGGTGGTGGTGGTCT GGTGGTGGTGGTCTCCGCCGTTCTCGATCTGAA
FL-Titin-R	CCCAAGCTTGGGACCGGTTCCGGATTCCAGAACAGACAGG
RL-Titin-F	ATCAACTTACCCGGGGAGGGCTGCAGCTAAGGAGGGCTGCTGCTAA GGAGGGCTGCTGCTAAGCCGCCGTTCTCGATCTGAA
RL-Titin-R	CCCAAGCTTGGGACCGGTTCCGGATTCCAGAACAGACAGG

1、pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig载体构建与表达

为了将*Age I*与*Hind III*酶切位点插入到pTIG-Int-Titin-4Ig质粒Titin-IntC之间，将编码Int-Titin-4Ig蛋白表达的基因序列分为片段1和片段2，利用同源重组原理设计特异性引物，分别进行PCR扩增后，再与经过线性化处理的pTIG-Int-Titin-4Ig质粒进行同源重组，得到添加*Age I*与*Hind III*酶切位点的质粒pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig。片段1与片段2的PCR扩增体系如下：

表37 PCR扩增体系 (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)
Table.37 PCR amplification system (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)

反应成分	反应体系
片段 1/2-F	1 μL
片段 1/2-R	1 μL
Q5 High-Fidelity 2×Master Mix	25 μL
pTIG-Int-Titin-4Ig	1 μL
ddH ₂ O	至 50 μL

PCR扩增条件如下：

表38 PCR扩增条件 (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)
Table.38 PCR amplification conditions (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min

保存	4°C	∞
----	-----	---

向扩增产物中加入10 μL的6×DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果。利用GeneJET Gel Extraction Kit胶回收目的条带。产物胶回收后, 按照下表建立同源重组体系;

表39 同源重组体系 (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)
Table.39 Homologous recombination system (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)

反应成分	反应体系
片段1	1 μL
片段2	1 μL
线性pTIG-Int-Titin-4Ig质粒	3 μL
2×Lightening Cloning Master Mix	5 μL

在50°C水浴锅内放置40 min, 完成后置于冰上进行下一步转化试验, 转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。分别挑取10个单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的大试管中, 37°C、200 rpm振荡培养16-18 h, 以培养液为模板分别进行菌液PCR鉴定。反应体系如下:

表40 菌液PCR鉴定体系 (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)
Table.40 PCR identification system of bacterial solution (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)

反应成分	反应体系
片段 1-F	1 μL
片段 2-R	1 μL
菌液	1 μL
1×Taq MasterMix	至 25 μL

PCR扩增条件如下:

表41 菌液PCR鉴定扩增条件 (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)
Table.41 PCR of the bacterial solution to identify the amplification conditions (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	40 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入5 μ L的6 \times DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果。将扩增得到预期大小条带的样本送上海生工公司测序。将测序正确的重组质粒命名为pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig, 利用质粒小提试剂盒进行质粒的提取。

取0.5 μ L构建成功的pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig质粒化学转化到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中, 均匀涂布到Amp-LB固体平板上, 37°C倒置培养直至出现单克隆。

挑取单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的试管中, 37°C、200 rpm振荡培养至对数生长中期(OD₆₀₀为0.5-1.0)后, 加入终浓度为1 mM的IPTG进行诱导表达, 20°C、200 rpm振荡培养24 h。通过收集菌体、超声破碎、取样进行SDS-PAGE电泳分析。

2、不同连接肽Titin-4Ig片段元件化

通过PCR分别将刚性连接肽与柔性连接肽与Titin-4Ig片段相连, 添加同尾酶酶切位点, 分别命名为RL-Titin-4Ig、FL-Titin-4Ig, 然后构建到中间载体上, 具体流程如下:

PCR扩增体系如下:

反应成分	反应体系
FL-Titin-F/RL-Titin-F	1 μ L
FL-Titin-R	1 μ L
Q5 High-Fidelity 2 \times Master Mix	25 μ L
pTIG-IntN-Titin-IntC	1 μ L
ddH ₂ O	至 50 μ L

PCR扩增条件如下:

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	58°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

PCR产物经1%琼脂糖电泳分析, 切胶回收目的产物, 连接中间载体pEASY-Blunt Zero, 转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞内, 分别挑取10个单克隆菌落至装有5 mL

Amp-LB液体培养基的大试管中, 37°C、200 rpm振荡培养16-18 h, 以培养液为模板分别进行菌液PCR鉴定。

反应体系如下:

表44 菌液PCR鉴定体系 (片段元件)
Table.44 PCR identification system of bacterial solution(Fragment Elementalization)

反应成分	反应体系
FL-Titin-F/RL-Titin-F	1 μL
FL-Titin-R	1 μL
菌液	1 μL
1 × Taq MasterMix	至 25 μL

PCR扩增条件如下:

表45 菌液PCR鉴定扩增条件 (片段元件)
Table.45 PCR of the bacterial solution to identify the amplification conditions(Fragment Elementalization)

PCR循环	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 sec
退火	56°C	50 sec
延伸	72°C	40 sec
循环数		34
延伸补齐	72°C	2 min
保存	4°C	∞

向扩增产物中加入5 μL的6×DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果。将扩增得到预期大小条带的样本送上海生工公司测序。将测序正确的重组质粒命名为

EASY-FL-Titin-4Ig

、

EASY-RL-Titin-4Ig

, 利用质粒小提试剂盒进行质粒的提取。

3、pTIG-Int-2Titin-4Ig重组质粒的构建与表达

将pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig、

EASY-FL-Titin-4Ig

、

EASY-RL-Titin-4Ig

质粒分别进行双酶切, 双酶切体系如下:

表46 双酶切体系 (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)
Table.46 Double digestion system (pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig)

反应体系组分	体积
pTIG-Int-Titin _{AH} -4Ig	8 μL
ddH ₂ O	8 μL
10 × Buffer	2 μL

<i>Age</i> I	1 μ L
<i>Hind</i> III	1 μ L
总体积	20 μ L

表47 双酶切体系 (*pEASY-FL/RL-Titin-4Ig*)
Table.47 Double digestion system (*pEASY-FL/RL-Titin-4Ig*)

反应体系组分	体积
<i>pEASY-FL-Titin-4Ig/RL-Titin-4Ig</i>	8 μ L
无菌水	8 μ L
10 \times Buffer	2 μ L
<i>Xma</i> I	1 μ L
<i>Hind</i> III	1 μ L
总体积	20 μ L

将样品分别充分混匀, 37°C酶切1 h后, 向酶切产物中加入4 μ L的6 \times DNA Loading Buffer, 充分混匀后上样于1%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 凝胶成像分析结果。切胶回收目的条带。

利用Quick Ligase Kit对上述两种胶回收产物进行快速连接 (25°C连接20 min), 连接体系如下:

表48 连接体系 (*pTIG-Int-2Titin-4Ig*)
Table.48 Connectivity system (*pTIG-Int-2Titin-4Ig*)

反应成分	反应体系
2 \times Reaction Buffer	10 μ L
<i>pTIG-IntN-Titin_{AH}-IntC</i> 酶切片段	3 μ L
FL-Titin-4Ig/RL-Titin-4Ig酶切片段	1 μ L
Quick Ligase	1 μ L
ddH ₂ O	至20 μ L

将上一步得到的连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中, 挑取单克隆菌落至装有5 mL Amp-LB液体培养基的大试管中, 37°C、200 rpm振荡培养16-18 h, 利用质粒小提试剂盒提取质粒, 分别进行双酶切鉴定, 酶切体系如下:

表49 双酶切体系 (*pTIG-Int-2Titin-4Ig*)
Table.49 Double digestion system (*pTIG-Int-2Titin-4Ig*)

反应体系组分	体积
质粒	8 μ L
ddH ₂ O	8 μ L
10 \times Buffer	2 μ L

<i>Xho</i> I	1 μ L
<i>Kpn</i> I	1 μ L
总体积	20 μ L

将鉴定正确的重组质粒分别命名为为pTIG-Int-FL-2Titin-4Ig（柔性连接肽）、pTIG-Int-RL-2Titin-4Ig（刚性连接肽），转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞，进行后续蛋白表达，具体实验步骤如上2.2.1

2.2.4 Titin-4Ig聚合物纯化及鉴定

一、Titin-4Ig聚合物纯化

使用Cytiva HisTrap HP柱亲和层析纯化Titin-4Ig聚合物，通过调整B液浓度，分别用10%B液洗脱杂蛋白、60%B液洗脱目的蛋白、100%B液洗脱剩余杂蛋白，流速2 mL/min，收集目的洗脱峰，利用SDS-PAGE电泳分析纯化样品。

二、Titin-4Ig聚合物鉴定

（1）体积排阻色谱法鉴定（SEC）

利用体积排阻色谱法对Titin-4Ig聚合物进行鉴定，分别对蛋白标准品与Titin-4Ig聚合物进行上样，具体实验步骤同上2.2.1，制作标准曲线，根据标准曲线计算各洗脱时间的蛋白大小。

（2）Western blot鉴定

使用制备好的抗血清稀释液作为一抗（1:30000）、HRP标记的山羊抗兔IgG稀释液（1:10000）作为二抗，对Titin-4Ig聚合物样品进行Western Blot分析，具体实验步骤同上2.2.1。

3 结果与分析

3.1 Titin-4Ig单体的表达及鉴定

3.1.1 pET22b-Titin-4Ig表达载体的构建

(1) pET22b-Titin-4Ig表达载体的构建

使用引物Int-Titin-4Ig-F、Int-Titin-4Ig-R，以pET22b-Int-Titin-4Ig质粒为模板进行PCR扩增，PCR产物经1%琼脂糖电泳，结果如图7所示。成功扩增出1146 bp左右的片段，大小与预期结果一致，说明扩增得到两端带有Nde I和Xho I酶切位点的Titin-4Ig基因片段。

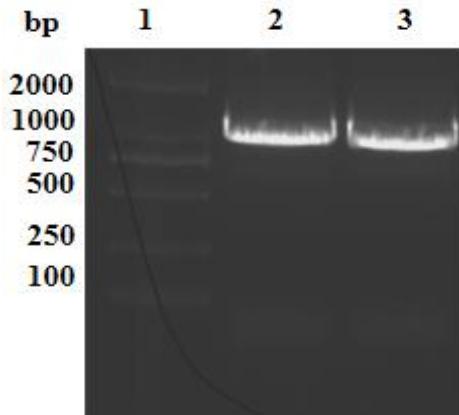


图7 Titin-4Ig基因PCR扩增结果

Fig.7 PCR amplification results of Titin-4Ig gene

注：泳道1：DL2000 Marker，泳道2-3：Titin-4Ig目的基因PCR扩增结果

利用Nde I和Xho I两个限制性核酸内切酶对胶回收产物以及pET22b-Int-Titin-4Ig质粒进行双酶切，1%琼脂糖电泳结果如图8所示，pET22b-Int-Titin-4Ig质粒经双酶切后得到两条带，大小分别与pET22b质粒骨架及Int-Titin-4Ig基因预期大小相符，表明双酶切效果理想。

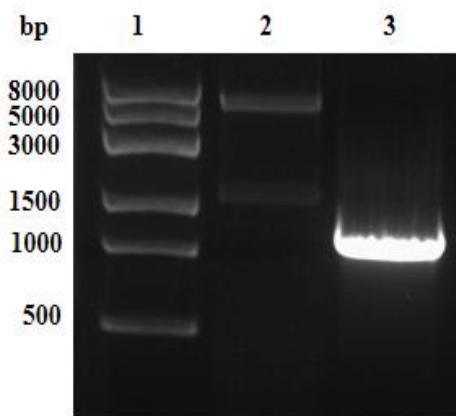


图8 Titin-4Ig基因与pET22b-Int-Titin-4Ig载体的酶切结果

Fig.8 Enzyme digestion results of Titin-4Ig gene and pET22b-Int-Titin-4Ig expression vector

注：泳道1：DL8000 Marker，泳道2：pET22b-Int-Titin-4Ig质粒的酶切结果，泳道3：Titin-4Ig PCR产物双酶切

(2) pET22b-Titin-4Ig表达载体的鉴定

双酶切片段经连接后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞，单克隆挑菌培养后经菌液PCR鉴定，结果如图9A所示，2-7号单克隆鉴定结果均为阳性。挑选阳性克隆送测序，

通过测定序列比对分析, 测定序列与预期序列一致, 结果如图9B所示, 证明pET22b-Titin-4Ig质粒构建成功。

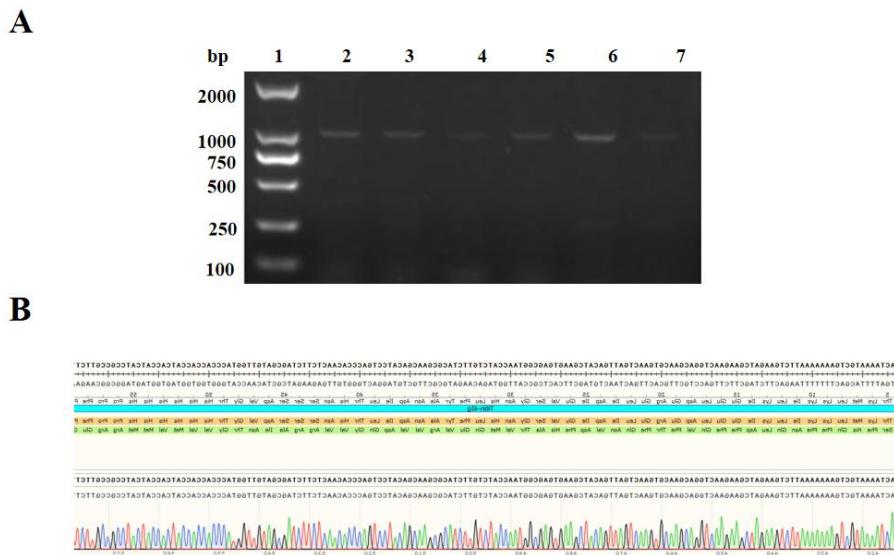


图9 pET22b-Titin-4Ig质粒鉴定结果
Fig.9 Identification of the pET22b-Titin-4Ig plasmid

注：图A：菌液PCR鉴定，泳道1：DL2000 Marker，泳道2-7：pET22b-Titin-4Ig/DH5 α 的菌液；图B：部分序列比对结果

3.1.2 Titin-4Ig蛋白表达

将重组表达载体pET22b-Titin-4Ig转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,诱导表达后进行SDS-PAGE凝胶电泳分析,以未加入IPTG诱导的裂解菌液作为对照(泳道2),可以发现大肠杆菌体内有特异性表达条带(泳道3),表达量占全菌蛋白的20%左右,大小约为43 kDa,与Titin-4Ig单体蛋白大小相符。通过表达形式分析,目的蛋白表达主要集中在上清中(泳道4),表现为可溶形式,只有少量为包涵体形式(泳道5),结果如图10所示。

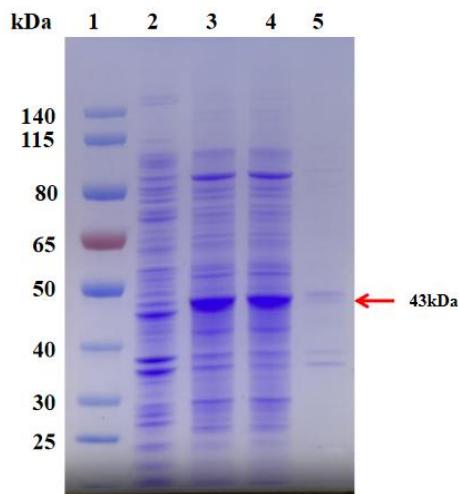


图10 Titin-4Ig蛋白单体表达形式电泳图

Fig.10 Electropherogram of Titin-4Ig protein monomer expression form

注：泳道1：Marker 26616，泳道2：pET22b-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液，泳道3：全菌，泳道4：上清，泳道5：沉淀

3.1.3 Titin-4Ig蛋白鉴定

利用商业化的抗人抗肌联蛋白兔多抗作为一抗进行Titin-4Ig蛋白单体的Western Blot鉴定,结果如图11所示,未发现特异性的条带(泳道3),证明此抗体不能识别目的蛋白。另外市场上没有针对兔肌联蛋白的商业化抗体,后续将进行Titin-4Ig兔多克隆抗体的制备。

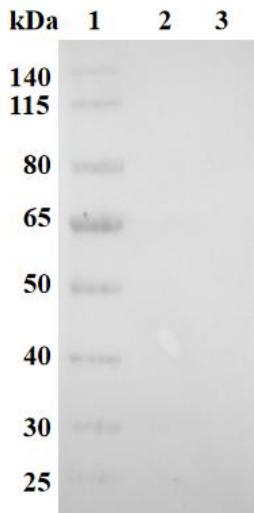


图11 Titin-4Ig蛋白单体Western Blot结果图

Fig.11 Titin-4Ig monomer Western Blot result

注:泳道1: Marker 26616, 泳道2: pET22b-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液, 泳道3: 全菌

3.2 Titin-4Ig多克隆抗体的制备

3.2.1 多克隆抗体制备

(1) Titin-4Ig蛋白纯化

按照上述诱导条件在摇瓶中对Titin-4Ig单体进行表达,经过离心收菌、超声破碎、离心澄清等处理,对收集的裂解上清通过亲和层析的方式进行纯化,通过SDS-PAGE分析纯化效果。由图12可见, Titin-4Ig单体蛋白在咪唑浓度为300 mM时被洗脱下来,只有符合单体蛋白大小的单一条带,纯度达到90%以上(泳道5)。

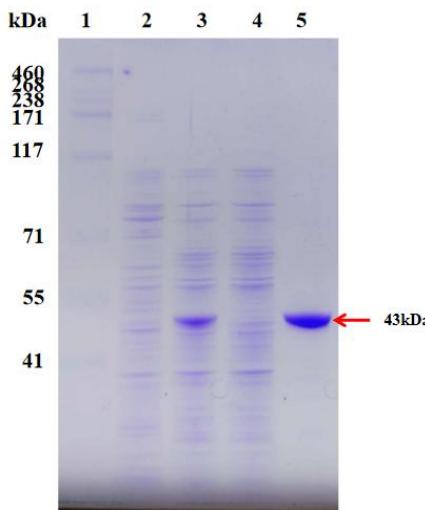


图12 Titin-4Ig蛋白单体亲和层析纯化电泳结果图

Fig.12 Diagram of Titin-4Ig protein monomeric purification electrophoresis results

注:泳道1: Marker LC5699, 泳道2: pET22b-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液, 泳道3: 重悬液, 泳道4: 穿过滤液, 泳道5: 300 mM咪唑洗脱液

(2) Titin-4Ig蛋白鉴定

利用抗His标签的His-Tag Polyclonal Antibody对Titin-4Ig蛋白单体进行Western Blot鉴定, 有特异性条带出现且符合预期大小(泳道3), 证明此蛋白为携带6×His标签的Titin-4Ig蛋白单体, 结果如图13所示。

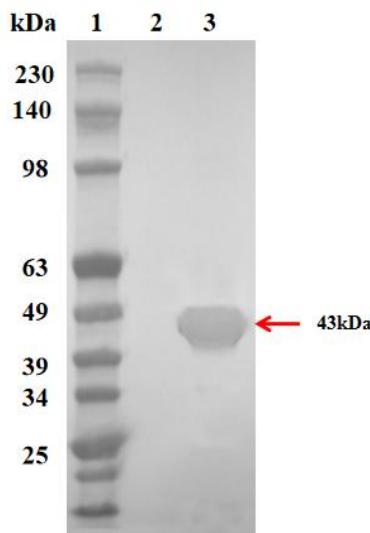


图13 Titin-4Ig蛋白Western Blot鉴定

Fig.13 Titin-4Ig protein Western Blot Identification

注: 泳道1: Marker 26616, 泳道2: pET22b-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液, 泳道3: Titin-4Ig蛋白纯化洗脱液

(3) Titin-4Ig蛋白定量

利用BCA蛋白浓度测定试剂盒对经过脱盐处理后的Titin-4Ig蛋白单体浓度进行测定, 利用标准品绘制标准曲线, 如图14所示 $R^2>0.999$, 表明标准曲线线性良好。通过计算可得Titin-4Ig蛋白浓度达到 $3.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 蛋白总量约为10 mg, 蛋白量足够支持开展后续实验。

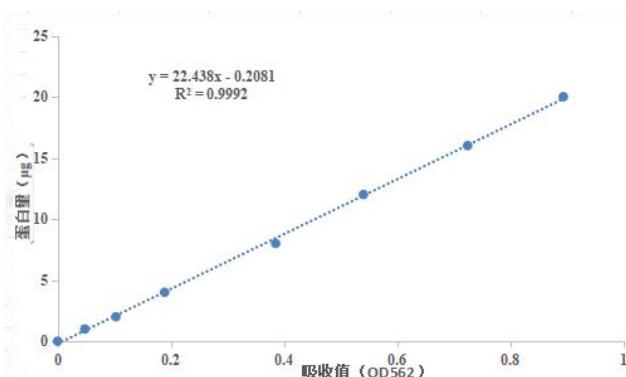


图14 蛋白定量标准曲线

Fig.14 Protein quantification standard curve

(4) Titin-4Ig蛋白纯度检测

通过优化HPLC的参数, 建立了基于蛋白质分子量差异的HPLC分离鉴定方法, 利用分子量标志物建立了洗脱体积与蛋白质分子量Log值相关关系的SEC标准曲线, 如图15所示, 标准品中主要含有以下四种蛋白标准品: 甲状腺球蛋白(640 kDa)、 γ -

球蛋白（155 kDa）、白蛋白（47 kDa）、核糖核酸酶A（13.7 kDa），所制标准曲线线性满足使用要求（ $R^2>0.999$ ），可以用于后续Titin-4Ig单体及聚合物的鉴定。

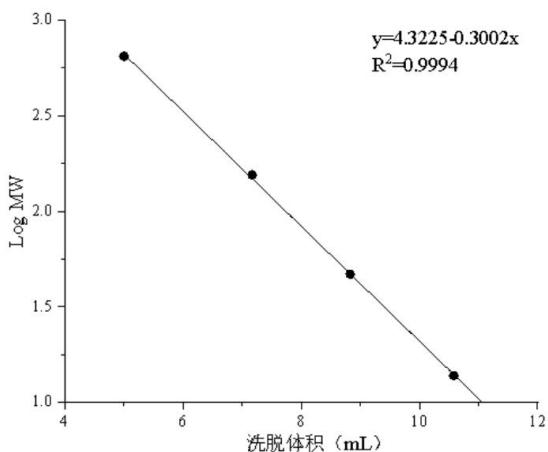


图15 SEC标准曲线
Fig.15 SEC standard curves

注：SEC标准品69385，色谱柱：Protein-Pak SEC Column, 300A, 10 μ m, 7.5 mm×300 mm, 洗脱条件：含200 mmol/L NaCl和20 mmol/L PBS 缓冲液（pH7.0），流速为0.5 mL/min, 上样体积100 μ L, 上样量200 μ g, 检测波长280nm

通过高效液相纯化的Titin-4Ig蛋白溶液进行纯度检测，根据在280 nm波长下检测到的出峰时间，利用标准曲线判断蛋白分子量符合Titin-4Ig单体大小。积分后峰面积比例进一步证明纯化后的Titin-4Ig蛋白纯度达到98.1%（图16），可满足后续实验要求。

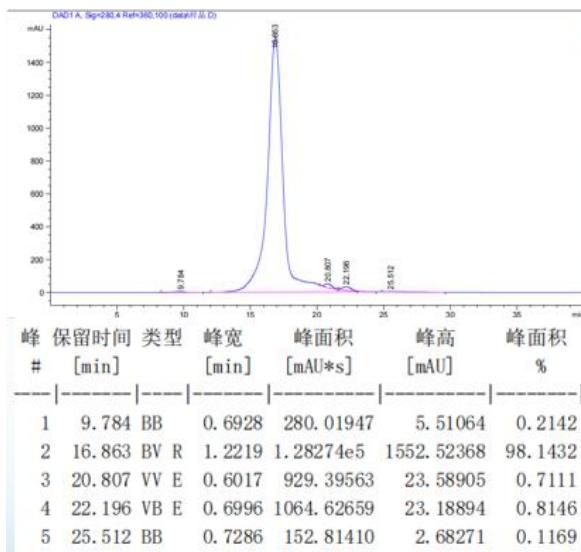


图16 Titin-4Ig蛋白纯度HPLC检测
Fig.16 Titin-4Ig protein purity HPLC assays

注：色谱柱：Protein-Pak SEC Column, 300A, 10 μ m, 7.5 mm×300 mm, 洗脱条件：含200 mmol/L NaCl和20 mmol/L PBS 缓冲液（pH7.0），流速为0.5 mL/min, 上样体积100 μ L, 上样量200 μ g, 检测波长280nm

3.2.2 多克隆抗体鉴定

（1）效价测定

完成兔免疫后，采血收集血清，采用间接ELISA法对多克隆抗体的效价进行测定，

免疫前所采血清作为阴性对照。根据测定可得，通过四针免疫后，兔血清中产生了相应的抗体，且根据稀释倍数为1:128000的抗血清与相同稀释倍数的阴性血清的Cutoff值>2.1，表明获得的抗体效价达到1:128000，结果如图17所示。

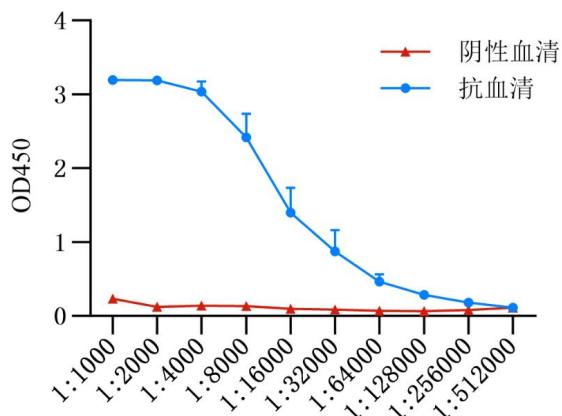


图17 ELISA检测抗Titin-4Ig兔血清的效价
Fig.17 ELISA tests the titer of anti-Titin rabbit serum

(2) 灵敏度

利用Western Blot方法对多克隆抗体的灵敏度进行测定，分别设置了1 ng、10 ng、20 ng、50 ng、80 ng、100 ng、200 ng、500 ng、1 μ g 9个实验组，一抗二抗稀释倍数分别为1:30000与1:10000，结果如图18所示。抗体在蛋白量为50 ng（泳道6）时有明显的特异性条带，在蛋白量为20 ng（泳道5）时也有符合大小的特异性条带出现，证明多克隆抗体的灵敏度较高。

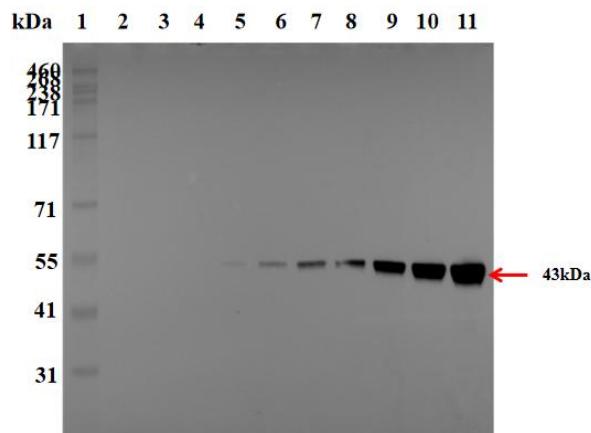


图18 抗Titin-4Ig兔血清灵敏度分析
Fig.18 Sensitivity analysis of anti-Titin rabbit serum

注：泳道1：Marker LC5699，泳道2：pET22b-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液，泳道3-11：Titin-4Ig蛋白量1 ng、10 ng、20 ng、50 ng、80 ng、100 ng、200 ng、500 ng、1 μ g

(3) 特异性分析

选取未诱导的裂解菌液、诱导后的裂解菌液、以及Titin-4Ig纯化蛋白三个样品通过Western Blot方法进行抗Titin兔血清的特异性分析，未诱导菌液（泳道2）中没有Titin-4Ig蛋白表达，也没有出现特异性的条带；诱导后的裂解菌液（泳道3）以及Titin-4Ig纯化蛋白（泳道4）都只有一条特异性的条带且大小符合预期（图19）。结

结果显示制备的抗Titin兔血清具有良好的特异性。

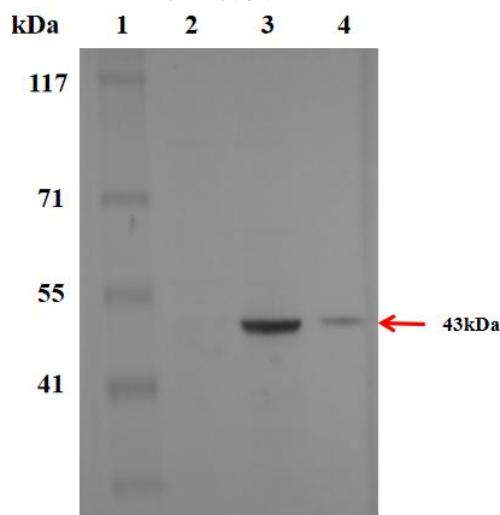


图19 抗Titin-4Ig兔血清特异性分析

Fig.19 Anti-Titin rabbit serum specificity analysis

注: 池道1: Marker 26616, 池道2: pET22b-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液, 池道3: 全菌, 池道4: Titin-4Ig蛋白纯化洗脱液

3.3 Titin-4Ig聚合物表达优化

3.3.1 Titin-4Ig聚合物表达

利用实验室已有的pET22b-Int-Titin-4Ig质粒转入BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达后通过SDS-PAGE电泳分析。如图20所示, Titin-4Ig聚合物在大肠杆菌成功表达, 并且出现了符合不同聚合度蛋白大小的条带(泳道5), 推测在内含肽剪接的过程中出现了部分环化的现象, 43 kDa、86 kDa、101 kDa分别对应单体环化、二聚体环化以及二聚体的蛋白大小, 更高聚合度的聚合物集中在171 kDa之上。并且Titin-4Ig聚合物表达主要集中在沉淀中(泳道5), 表现为包涵体形式, 所以后续将进行针对性的优化。

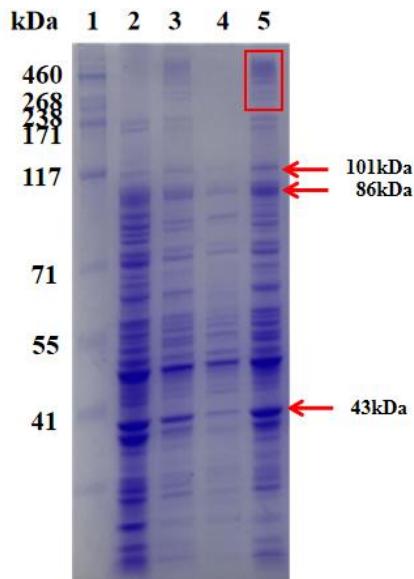


图20 Titin-4Ig聚合物表达

Fig.20 Titin-4Ig polymer expression

注: 池道1: Marker LC5699, 池道2: pET22b-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液, 池道3: 全菌, 池道4: 上清液, 池道5: 沉淀

3.3.2 Titin-4Ig聚合物表达优化

(1) 启动子优化

使用引物InN-F/R, 以pET22b-Int-Titin-4Ig质粒为模板进行PCR扩增, PCR产物经1%琼脂糖电泳, 成功扩增出1590 bp左右的片段, 大小与预期结果一致, 说明扩增得到了Titin-4Ig基因片段(图21A)。然后利用引物pCold-F/R对pCold II载体进行线性化处理(图21B), 经1%琼脂糖电泳分析, 条带大小正确。

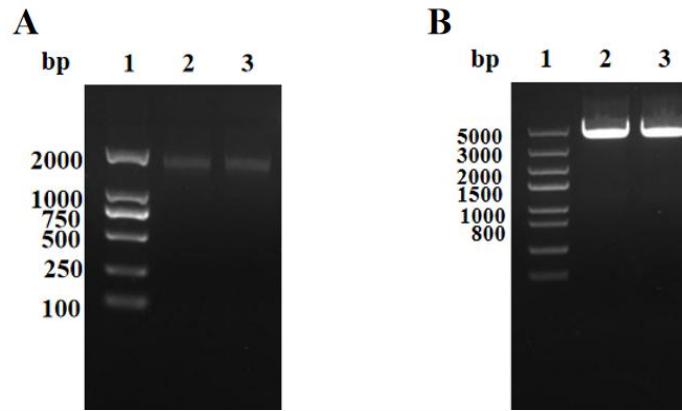
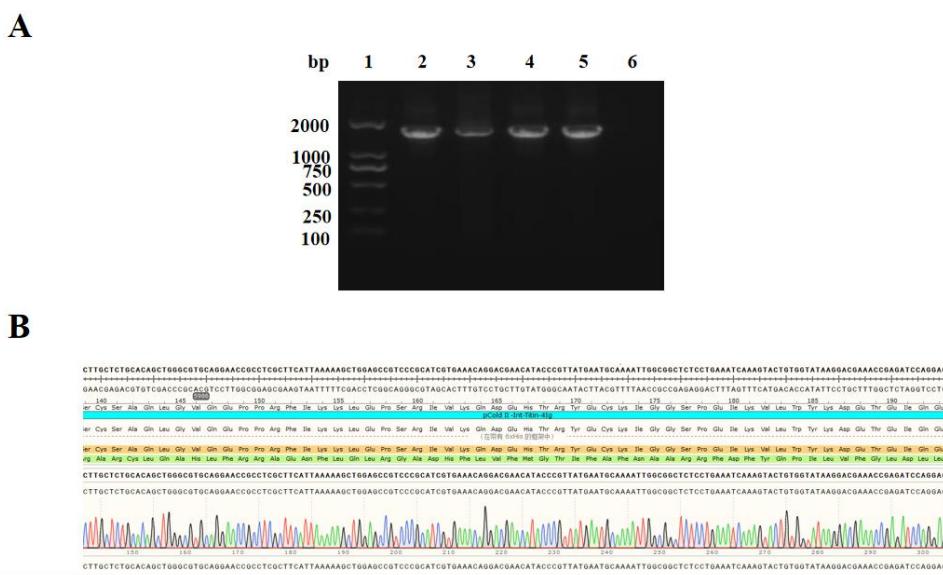


图21 pCold II-Int-Titin-4Ig质粒构建
Fig.21 pCold II-Int-Titin-4Ig plasmid construction

注: 图A, 池道1: DL2000 Marker, 池道2-3: Int-Titin-4Ig片段PCR扩增; 图B, 池道1: DL5000 Marker, 池道2-3: pCold II载体PCR线性化处理

对上述回收的片段进行同源重组连接转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 涂Amp-LB平板, 37°C倒置培养, 挑取单菌落至含有5 mL的Amp-LB液体培养基的试管中培养, 通过菌液PCR进行鉴定, 扩增产物也与预期大小一致(图22A), 阳性克隆质粒测序结果经序列比对与预期序列一致(图22B), 证明pCold II-Int-Titin-4Ig质粒构建成功。



包涵体形式存在。分析原因可能是pET系列载体携带的T7启动子过强，导致蛋白在翻译后快速折叠出现结构错误，从而形成包涵体。针对这个问题，我们通过更换携带冷休克启动子cspA的pCold II载体进行尝试，cspA启动子虽然在37°C也能进行转录，但其下游的5'UTR非常不稳定，所以不能高效地翻译。但是当温度从37°C下降到15°C后，5'UTR的结构变得非常稳定，翻译效率提高，在15°C低温下蛋白质的合成效率非常高。结果如图23所示，更换pCold II载体后，Titin-4Ig聚合物可以正常表达，而且主要为可溶形式。15°C的低温会降低蛋白表达速度，使得蛋白有时间充分进行折叠，表达形式相对之前的37°C和20°C有很大改善，但是聚合物表达量相对较少。

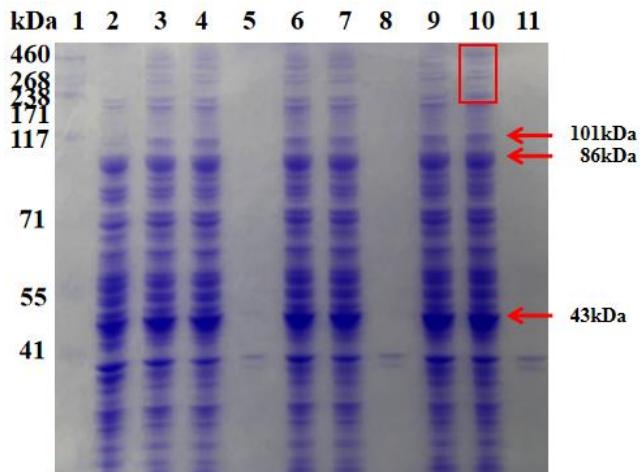


图23 Titin-4Ig 聚合物表达 (cspA)

Fig.23 Titin-4Ig polymer expression electropherogram (cspA)

注：泳道1：Marker LC5699，泳道2：pCold II-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液，泳道3-5：单克隆1的全菌、上清、沉淀，泳道6-8：单克隆2的全菌、上清、沉淀，泳道9-11：单克隆3的全菌、上清、沉淀

(2) 分子伴侣—转化助溶表达感受态宿主

将pET22b-Int-Titin-4Ig质粒转入RTS BL21(DE3) Chaprone助溶表达感受态细胞中，先通过L-阿拉伯糖诱导 `dnaK`、 `dnaJ`、 `grpE`分子伴侣蛋白表达，然后再利用四环素诱导剩余两种 `groES`、 `groEL`表达，到五种分子伴侣蛋白到达一定量之后。再诱导目的蛋白的表达，以此达到利用分子伴侣协助目的蛋白正确折叠形成可溶性蛋白的目的。但是从图24所示电泳结果分析，并没有与Titin-4Ig单体及聚合物大小相符的特异性表达条带（泳道3），分析原因可能是由于宿主菌的不匹配所导致。

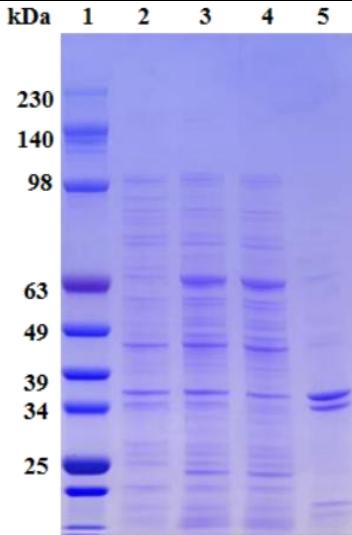


图24 Titin-4Ig聚合物表达 (助溶感受态)

Fig.24 Titin-4Ig polymer expression (solubil-competent)

注：泳道1：Marker 26630，泳道2：未诱导菌液，泳道3：全菌，泳道4：上清，泳道5：沉淀

(3) 分子伴侣—硫氧还蛋白 (Trx) 共表达

硫氧还蛋白 (Trx) 具有良好的促溶效果, 所以我们将Int-Titin-4Ig连入含有Trx基因的pTIG载体中, 使Int-Titin-4Ig与Trx共表达。首先通过PCR扩增的方式, 扩增出两端带有 $EcoR$ I与 Xho I酶切位点的目的片段, 片段大小约为1596 bp (图25A), 与预期结果一致, 然后对扩增的目的基因与pTIG质粒进行双酶切, 片段酶切得到1590 bp左右的片段 (图25B), 质粒酶切分别得到约为3700 bp与5700 bp的片段 (图25C), 条带大小全部正确。

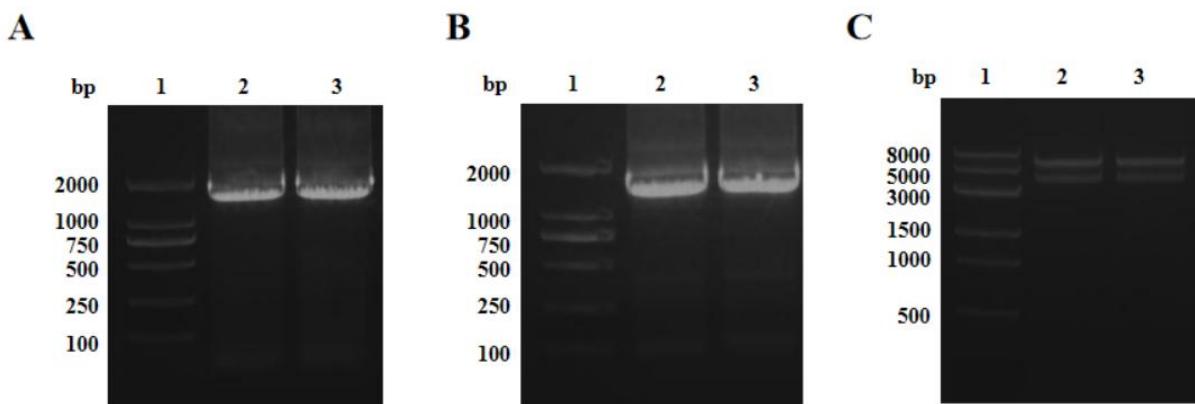


图25 pTIG-Int-Titin-4Ig质粒构建

Fig.25 pTIG-Int-Titin-4Ig plasmid construction

注：图A, 泳道1：DL2000 Marker, 泳道2-3：Int-Titin-4Ig片段PCR扩增；图B, 泳道1：DL2000 Marker, 泳道2-3：Int-Titin-4Ig片段双酶切；图C, 泳道1：DL8000 Marker, 泳道2-3：pTIG质粒双酶切

对上述酶切回收的片段进行连接后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 涂Amp-LB平板, 37°C倒置培养, 挑取单菌落至含有5 mL的Amp-LB液体培养基的试管中, 37°C、200 rpm振荡培养, 通过菌液PCR进行鉴定, 扩增产物与预期大小一致 (图26A), 挑选阳性克隆质粒测序结果经序列比对与预期序列一致 (图26B), 证明pTIG-Int-Titin-4Ig质粒构建成功, 图26C为pTIG-Int-Titin-4Ig质粒图谱。

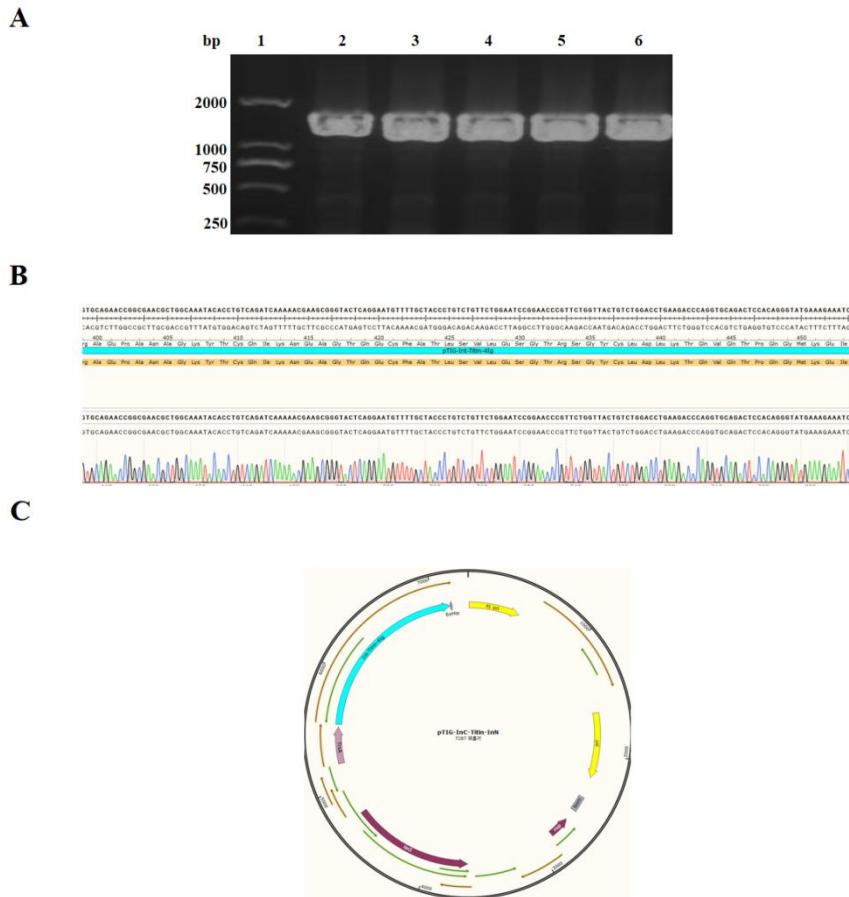


图26 pTIG-Int-Titin-4Ig质粒鉴定

Fig.26 pTIG-Int-Titin-4Ig plasmid identification

注：图A，菌液PCR鉴定，泳道1：DL2000 Marker，泳道2-6：pTIG-Int-Titin-4Ig/DH5 α 的菌液；图B，部分序列比对结果；图C，pTIG-Int-Titin-4Ig质粒图谱

将构建好的pTIG-Int-Titin-4Ig质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞，从转化平板挑单克隆菌落进行培养，经过诱导后成功表达Titin-4Ig聚合物，单体以及多聚体的表达量相对增多，并且主要集中在上清中，表现为可溶形式，证明此种优化方式具有良好效果（图27）。

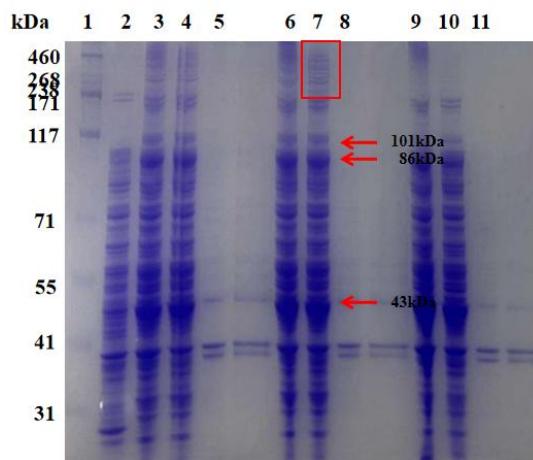


图27 Titin-4Ig聚合物表达 (Trx)

Fig.27 Titin-4Ig polymer expression (Trx)

注：泳道1：Marker LC5699，泳道2：pTIG-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液，泳道3-5：单克隆1的全菌、上清、沉淀，泳道6-8：单克隆2的全菌、上清、沉淀，泳道9-11：单克隆3的全菌、上清、沉淀

(4) 组合优化: 使用cspA启动子及硫氧还蛋白Trx共表达

设计特异性引物, 利用PCR扩增的方式将 Bgl II与 Nde I酶切位点分别添加到cspA启动子(P_{cspA})片段的两端, 结果如图28, 1%琼脂糖电泳片段大小约为297 bp, 条带符合预期大小。

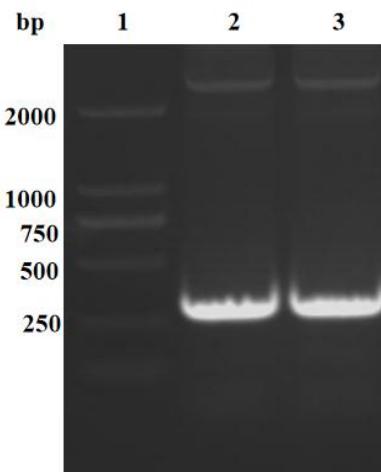


图28 cspA启动子片段PCR电泳图

Fig.28 PCR electropherogram of cspA promoter fragment

注: 洋道1: DL2000 Marker, 洋道2-3: cspA启动子片段PCR扩增

利用 Bgl II与 Nde I对片段与载体进行双酶切, cspA启动子片段(图29A)酶切后大小为291 bp, pTIG-Int-Titin-4Ig载体(图29B)酶切后片段大小分别约为7170 bp和261 bp, 条带大小全部正确, 分别对291 bp、7170 bp片段进行胶回收。

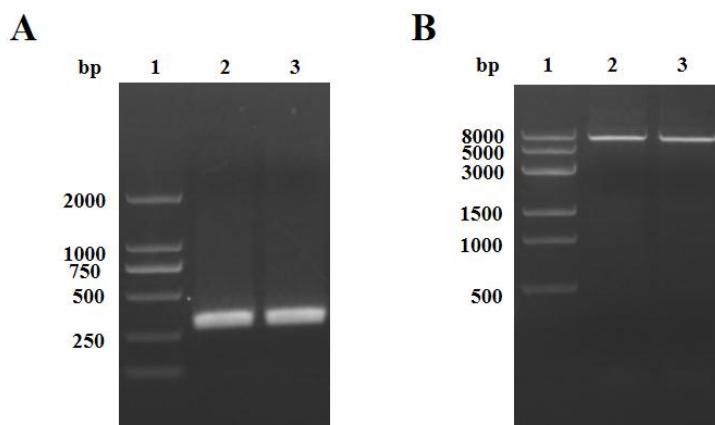


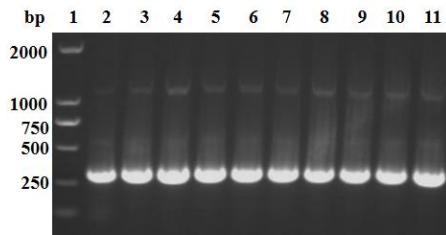
图29 cspA启动子片段与pTIG-Int-Titin-4Ig载体双酶切电泳图

Fig.29 Electropherogram of cspA promoter fragment and pTIG-Int-Titin-4Ig vector

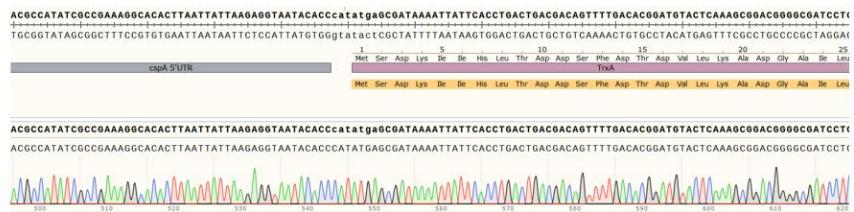
注: 图A, 洋道1: DL2000 Marker, 洋道2-3: cspA启动子片段双酶切; 图B, 洋道1: DL8000 Marker, 洋道2-3: pTIG质粒双酶切

对上述酶切回收的片段进行连接转化DH5 α 感受态细胞, 涂Amp-LB平板, 37°C倒置培养, 挑取单菌落至含有5 mL的Amp-LB液体培养基的试管中, 37°C、200 rpm振荡培养, 通过菌液PCR进行鉴定, 扩增产物也与预期大小一致(图30A), 阳性克隆质粒测序结果经序列比对与预期序列一致(图30B), 证明pTIG- P_{cspA} -Int-Titin-4Ig质粒构建成功。

A



B

图30 pTIG-P_{cspA}-Int-Titin-4Ig质粒鉴定Fig.30 Identification of the pTIG-P_{cspA}-Int-Titin-4Ig plasmid

注：图A，泳道1：DL2000 Marker，泳道2-11：pTIG-P_{cspA}-Int-Titin-4Ig/DH5_a的菌液；图B，部分序列比对结果

将构建好的pTIG-P_{cspA}-Int-Titin-4Ig质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞，从转化平板挑取单菌落至含有5 mL的Amp-LB液体培养基的试管中，37°C、200 rpm振荡培养，然后诱导表达。结果如图31所示，Titin-4Ig聚合物经过诱导可以表达（泳道3），且表达主要为可溶形式（泳道4），但是Titin-4Ig单体以及多聚体的表达量明显减少，证明此种优化方式对于表达形式的优化具有一定效果，但是对于蛋白的表达量没有明显的提升，并未出现预期的叠加改进效果。

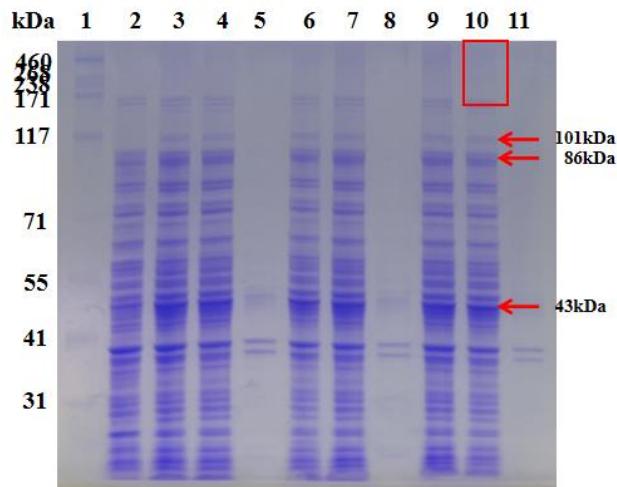


图31 Titin-4Ig聚合物表达 (Trx+cspA)

Fig.31 Titin-4Ig polymer expression (Trx+cspA)

注：泳道1：Marker LC5699，泳道2：pTIG-P_{cspA}-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液，泳道3-5：单克隆1的全菌、上清、沉淀，泳道6-8：单克隆2的全菌、上清、沉淀，泳道9-11：单克隆3的全菌、上清、沉淀

(5) 无细胞表达系统

由于无细胞表达系统具备不受细胞自身代谢和细胞封闭环境限制，能在体外快速、大量表达蛋白等诸多优势。所以利用大肠杆菌无细胞表达系统对Titin-4Ig聚合物进行

表达优化，使用的试剂盒优选T7启动子作为转录启动元件，所以我们直接将构建好的含有目的基因的pET系列载体置于无细胞表达系统中进行蛋白表达。如图32所示，试剂盒携带的GFP绿色荧光蛋白作为阳性对照，可以正常表达，且荧光蛋白大小正确（泳道2），说明试剂盒和表达条件正常。但是转入的2种质粒均无法正常表达Titin-4Ig聚合物（泳道5-6），分析原因可能是无细胞表达系统对于所表达的蛋白大小有一定限制，导致无法表达Titin-4Ig聚合物这种大分子蛋白质。

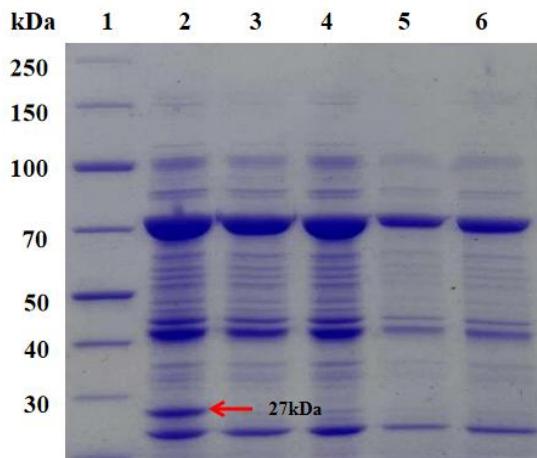


图32 Titin-4Ig聚合物无细胞表达

Fig.32 Titin-4Ig polymer no-cell expression

注：泳道1：Marker 26630，泳道2：阴性对照，泳道3：阳性对照，泳道4：pET22b质粒，泳道5：pTIG--Int-Titin-4Ig质粒，泳道6：pET22b--Int-Titin-4Ig质粒

（6）诱导条件优化

将重组菌株 pTIG-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3) 在 37°C、200 rpm 条件下培养至 $OD_{600}=1-1.5$ ，按照正交实验设计的不同诱导温度、时间及诱导剂浓度进行目的蛋白的诱导表达，SDS-PAGE蛋白电泳检测结果如下所示。

20°C诱导目的蛋白表达（图33），当诱导时间达到24 h时，目的蛋白表达量都会达到饱和，20°C-24 h-0.5 mM这一诱导条件蛋白表达水平最高。

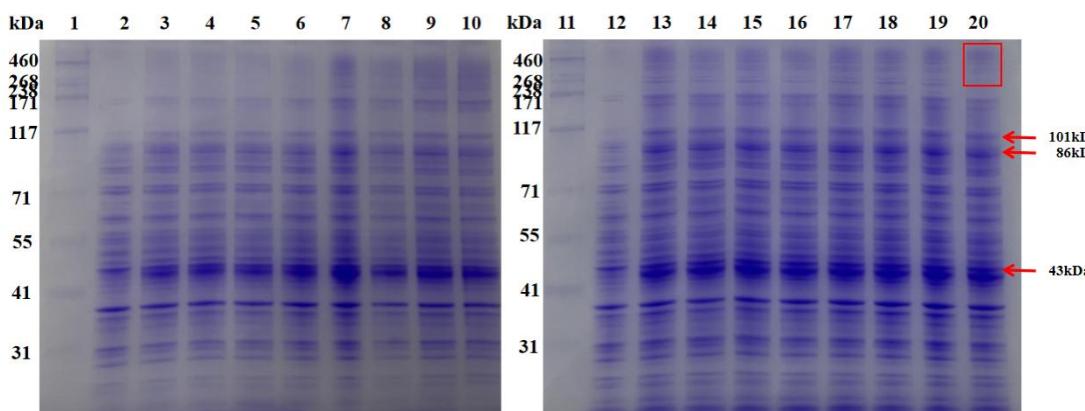


图33 Titin-4Ig聚合物诱导条件优化（20°C诱导）

Fig.33 Titin-4Ig polymer induction conditions were optimized(20°C induction)

注：20°C诱导，泳道1、11：Marker LC5699，泳道2、12：未诱导菌液，泳道3-6：诱导4 h，诱导剂浓度0.1、0.2、0.5、1mM，泳道7-10：诱导12 h，泳道13-16：诱导24 h，泳道17-20：诱导36 h

30°C诱导目的蛋白表达（图34），诱导时间为24 h时，目的蛋白表达量最高，其中30°C-24 h-0.5 mM这一诱导条件蛋白表达水平最高。

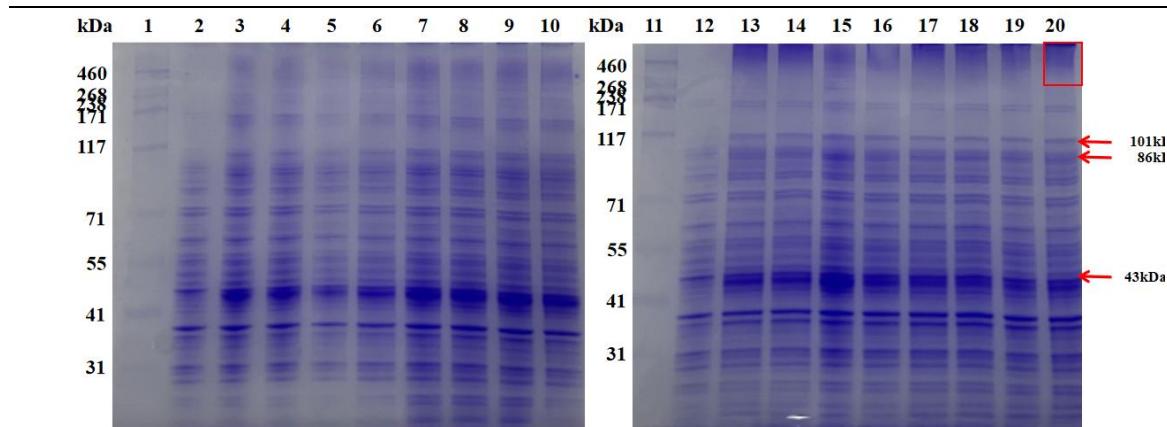


图34 Titin-4Ig聚合物诱导条件优化 (30°C诱导)

Fig.34 Titin-4Ig polymer induction conditions were optimized(30°C induction)

注: 30°C诱导, 泳道1、11: Marker LC5699, 泳道2、12:未诱导菌液, 泳道3-6: 诱导4 h, 诱导剂浓度0.1、0.2、0.5、1mM, 泳道7-10: 诱导12 h, 泳道13-16: 诱导24 h, 泳道17-20: 诱导36 h

37°C诱导目的蛋白表达(图35), 诱导时间为12h时, 目的蛋白表达量就会达到最高, 其中37°C-12 h-0.5 mM这一诱导条件蛋白表达水平最高。

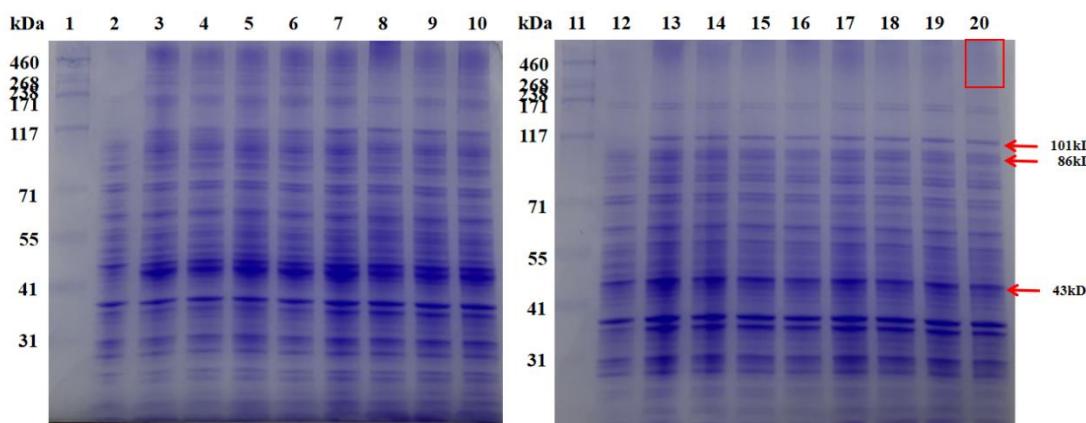


图35 Titin-4Ig聚合物诱导条件优化 (37°C诱导)

Fig.35 Titin-4Ig polymer induction conditions were optimized(37°C induction)

注: 37°C诱导, 泳道1、11: Marker LC5699, 泳道2、12:未诱导菌液, 泳道3-6: 诱导4 h, 诱导剂浓度0.1、0.2、0.5、1mM, 泳道7-10: 诱导12 h, 泳道13-16: 诱导24 h, 泳道17-20: 诱导36 h

不同温度诱导下, 在诱导剂浓度为0.5 mM与1 mM时, 表达效果更优于0.1 mM与0.2 mM, 但是0.5 mM与1 mM之间差异不明显。我们选取了在不同温度条件诱导下表达最好的实验组, 分别为20°C-24 h-0.5 mM、30°C-24 h-0.5 mM、37°C-12 h-0.5 mM进行了表达形式的分析, 结果如图36所示, 30°C与37°C实验组相比20°C实验组表达量更多, 但是主要表现为包涵体形式, 所以采用诱导温度20°C、诱导剂浓度0.5 mM IPTG、诱导时长24 h这一条件进行后续实验。

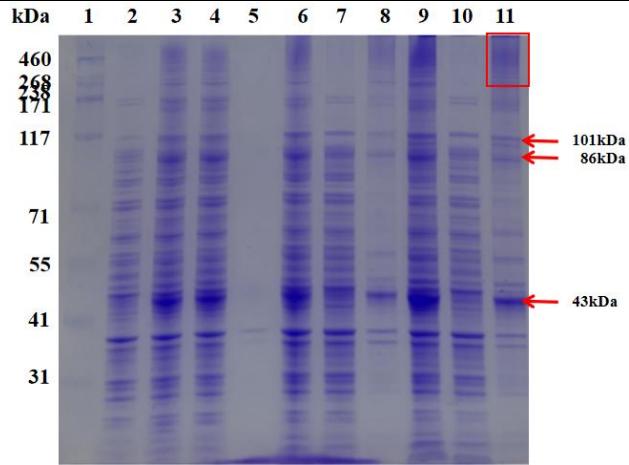


图36 Titin-4Ig聚合物诱导条件优化对比
Fig.36 Titin-4Ig polymer induction conditions were optimized

注：泳道3-5：20℃实验组全菌、上清、沉淀，泳道6-8：30℃实验组全菌、上清、沉淀，泳道9-11：37℃实验组全菌、上清、沉淀

（7）多倍Titin-4Ig单体聚合

1、pTIG-Int-TitinAH-4Ig载体构建与表达

利用同源重组原理设计引物，分别对片段1与片段2进行PCR扩增，分别得到1206 bp（图37A）和288 bp（图37B）大小的片段，片段大小正确；然后利用 *Kpn* I、*Xho* I 酶切线性化处理pTIG-Int-TitinAH-4Ig载体，得到片段大小约为5793 bp与1458 bp，符合实验预期，分别对1206 bp、288 bp、5793 bp片段进行胶回收。

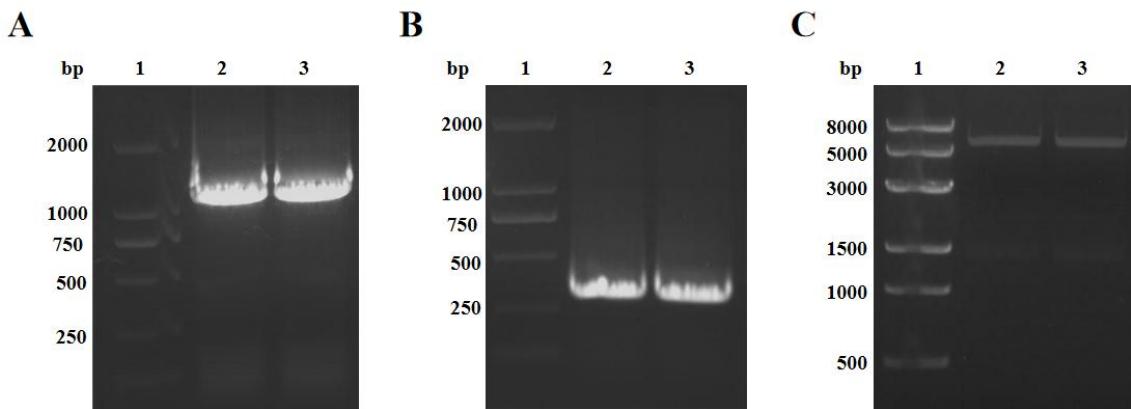


图37 pTIG-Int-TitinAH-4Ig载体构建
Fig.37 pTIG-Int-TitinAH-4Ig vector construction

注：图A，泳道1：DL2000 Marker，泳道2：片段1 PCR；图B，泳道1：DL2000 Marker，泳道2-3：片段2 PCR；图C，泳道1：DL8000 Marker，泳道2-3：pTIG-Int-TitinAH-4Ig质粒双酶切

对上述酶切回收的片段进行同源重组后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞，涂Amp-LB平板，37℃倒置培养，挑取单菌落至含有5 mL的Amp-LB液体培养基的试管中，37℃、200 rpm振荡培养，通过菌液PCR进行鉴定，电泳条带与预期大小一致（图38A），阳性克隆质粒测序结果经序列比对与预期序列一致（图38B），证明在pTIG-Int-Titin-4Ig载体上成功添加 *Age* I与 *Hind* III酶切位点。

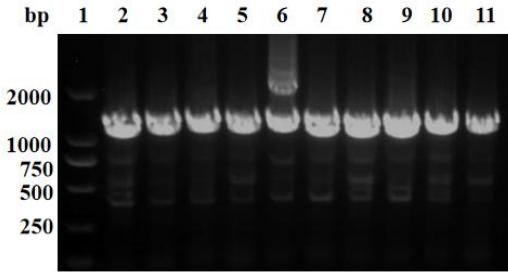
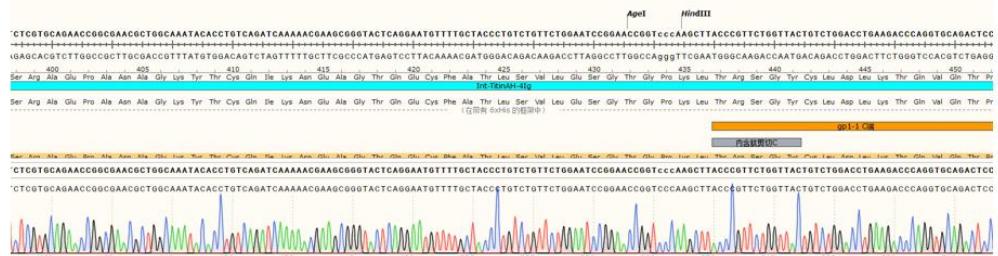
A**B**

图38 pTIG-Int-TitinAH-4Ig载体鉴定

Fig.38 Identification of the pTIG-Int-TitinAH-4Ig vector

注：图A，泳道1：DL2000 Marker，泳道2-11：pTIG-Int-TitinAH-4Ig/DH5 α 菌液；图B，部分序列比对结果

2、不同连接肽Titin-4Ig片段元件化

通过PCR分别将刚性连接肽（图39A）、柔性连接肽（图39B）与Titin-4Ig片段相连，PCR产物经过1%琼脂糖电泳，刚性连接肽Titin-4Ig（RL-Titin-4Ig）、柔性连接肽Titin-4Ig（FL-Titin-4Ig）大小都为1134 bp，条带均符合预期大小。

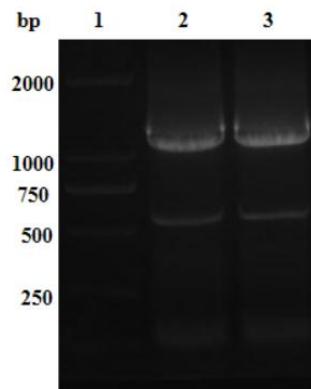
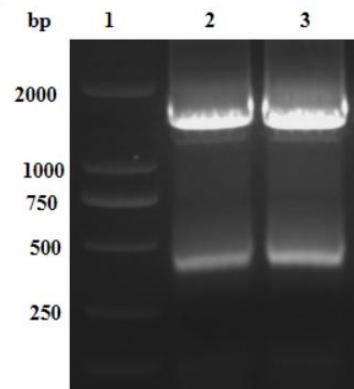
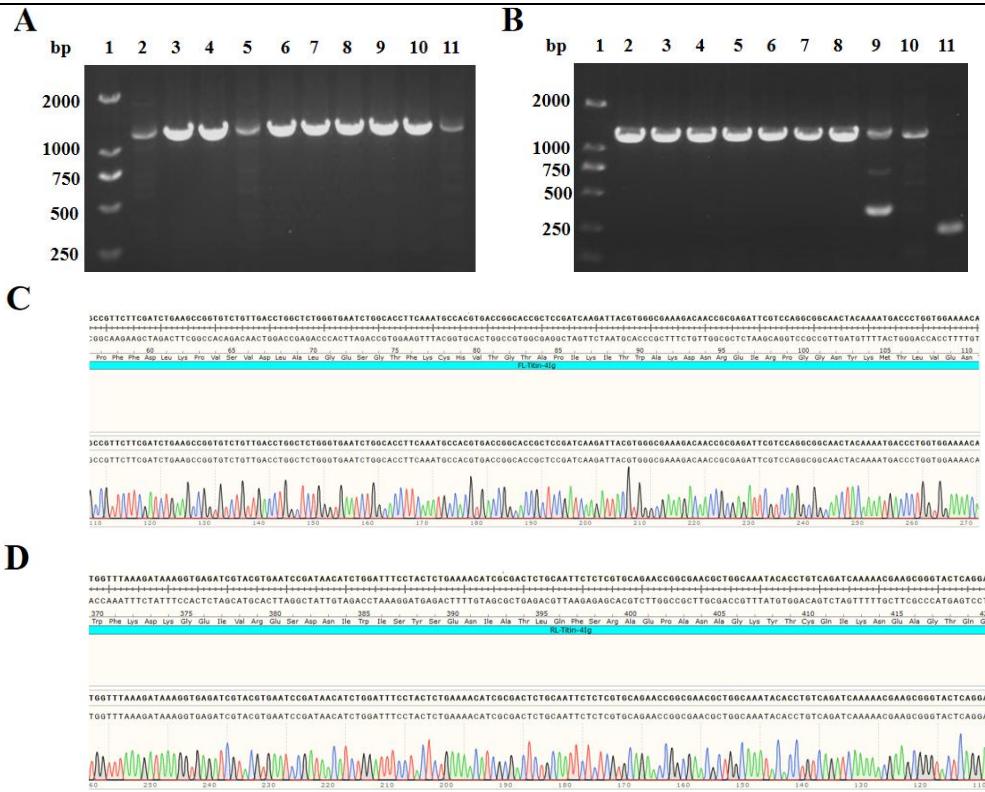
A**B**

图39 连接肽Titin-4Ig PCR结果

Fig.39 Ligation peptide Titin-4Ig PCR results

注：图A，泳道1：DL2000 Marker，泳道2-3：刚性连接肽Titin-4Ig融合PCR；图B，泳道1：DL2000 Marker，泳道2-3：柔性连接肽Titin-4Ig融合PCR

将柔性连接肽Titin-4Ig（FL-Titin-4Ig）、刚性连接肽Titin-4Ig（RL-Titin-4Ig）片段分别连接到pEASY-Blunt Zero中间载体上，转化后进行菌液PCR鉴定，结果显示柔性组（图40A）与刚性组（图40B）菌液PCR扩增条带大小都符合预期，阳性克隆质粒测序结果经序列比对与预期序列一致（图40C、D），证明pEASY-FL-Titin-4Ig、pEASY-RL-Titin-4Ig质粒构建成功。

图40 *pEASY-FL-Titin-4Ig*、*pEASY-RL-Titin-4Ig*质粒鉴定Fig.40 *pEASY-FL-Titin-4Ig*、*pEASY-RL-Titin-4Ig* plasmid identification

注: 图A, 泳道1: DL2000 Marker, 泳道2-11: *pEASY-FL-Titin-4Ig*/DH5 α 的菌液; 图B, 泳道1: DL2000 Marker, 泳道2-11: *pEASY-RL-Titin-4Ig*/DH5 α 的菌液; 图C, 部分序列比对结果(柔性); 图D, 部分序列比对结果(刚性)

3、pTIG-Int-2Titin-4Ig重组质粒的构建与表达

对 pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig (图 41A)、*pEASY-FL-Titin-4Ig* (图 41B)、*pEASY-RL-Titin-4Ig* (图41C)载体进行双酶切, 得到的目的条带分别为7292 bp、1128 bp、1128 bp, 条带大小都符合预期, 分别对目的片段进行胶回收。

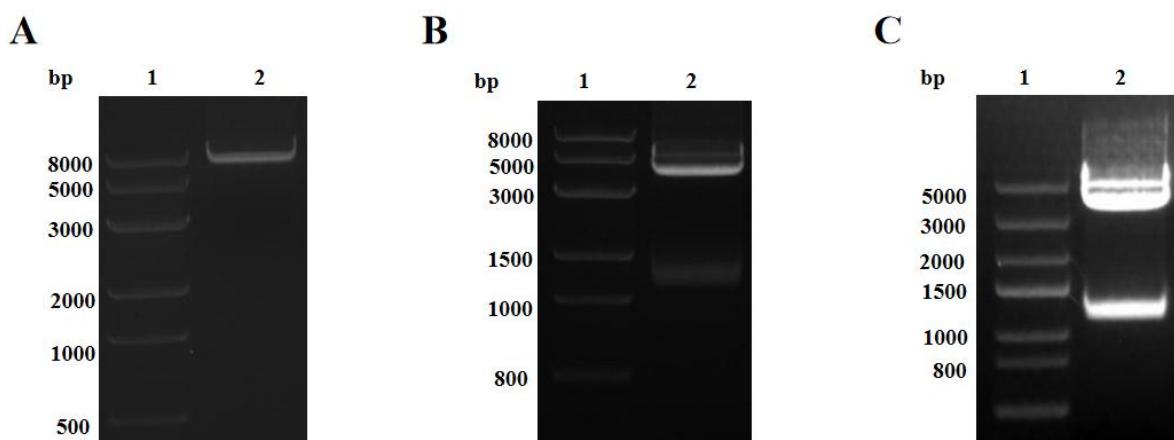


图41 pTIG-Int-2Titin-4Ig载体构建

Fig.41 pTIG-Int-2Titin-4Ig vector construction

注: 图A, 泳道1: DL8000 Marker, 泳道2: pTIG-Int-TitinAH-4Ig双酶切; 图B, 泳道1: DL8000 Marker, 泳道2: *pEASY-FL-Titin-4Ig*质粒双酶切; 图C, 泳道1: DL5000 Marker, 泳道2: *pEASY-RL-Titin-4Ig*载体双酶切

目的片段连接、转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 挑单菌落培养并提取质粒进行双酶切验证, 刚性组pTIG-Int-RL-2Titin-4Ig质粒(图42A)和柔性pTIG-Int-FL-2Titin-4Ig

质粒（图42B）双酶切均得到7353 bp、1128 bp两条条带，条带大小正确，证明质粒构建成功。

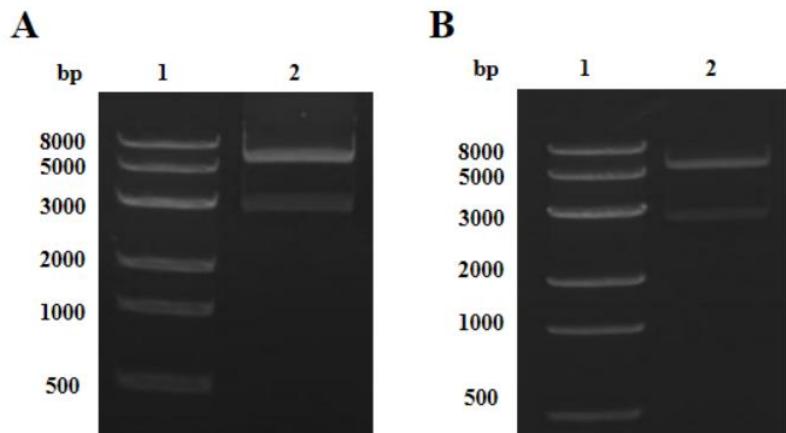


图42 pTIG-Int-2Titin-4Ig载体双酶切鉴定

Fig.42 Identification of pTIG-Int-2Titin-4Ig vector double digestion

注：图A，泳道1：DL8000 Marker，泳道2：pTIG-Int-RL-2Titin-4Ig载体双酶切；图B，泳道1：DL8000 Marker，泳道2：pTIG-Int-FL-2Titin-4Ig载体双酶切

对构建好的pTIG-Int-Titin_{AH}-4Ig质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞，诱导表达后裂解菌体进行SDS-PAGE分析，结果显示与插入前相比，蛋白表达量与表达形式都没有明显的变化，说明 $Age\text{ I}$ 与 $Hind\text{ III}$ 酶切位点的插入并没有影响Titin-4Ig聚合物的正常表达（图43）。

将构建好的刚性pTIG-Int-RL-2Titin-4Ig和柔性pTIG-Int-FL-2Titin-4Ig质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)，挑取单克隆培养并经IPTG诱导表达，SDS-PAGE电泳结果如图43所示。可以发现，不管是通过刚性连接肽（泳道8）还是柔性连接肽（泳道11）的Titin-4Ig二倍体质粒，聚合物的表达量基本相同，表达形式都以可溶形式为主（泳道9、12）。相较于之前Titin-4Ig单体质粒表达的来说，Titin-4Ig二倍体质粒是在Titin-4Ig二倍体上进行剪切聚合，极大提升了蛋白的聚合度；但是聚合物的表达量有一定程度的降低。

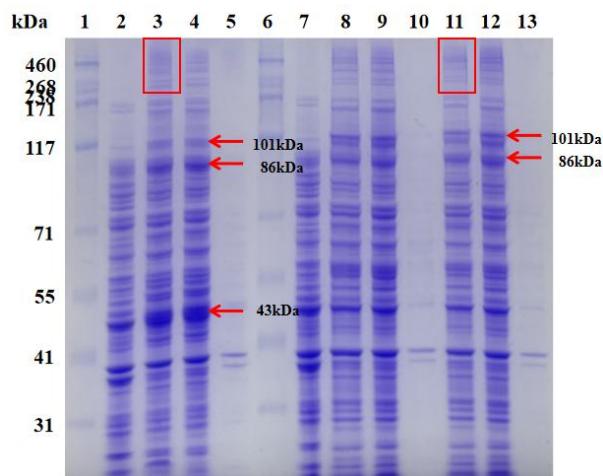


图43 Int-2Titin-4Ig蛋白表达
Fig.43 Int-2Titin-4Ig protein expression

注：泳道1、6：Marker LC5699，泳道2、7：pTIG空质粒/BL21(DE3)菌液，泳道3-5：pTIG-Int-TitinAH-4Ig/BL21(DE3)单克隆全菌、上清、沉淀，泳道8-10：pTIG-Int-FL-2Titin-4Ig/BL21(DE3)单克隆2的全菌、上清、沉淀，泳道11-13：pTIG-Int-RL-2Titin-4Ig/BL21(DE3)单克隆的全菌、上清、沉淀

3.4 Titin-4Ig聚合物纯化及鉴定

3.4.1 Titin-4Ig聚合物纯化

通过前期的多种方式的优化, Titin-4Ig聚合物的表达有明显的改善。后续利用亲和层析的方式对pTIG-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)菌液裂解离心后的上清液进行纯化, 结果如图44所示, Titin-4Ig环化单体(43 kDa)、环化二聚体(86 kDa)、二聚体(101 kDa)以及其它多聚物在洗脱液咪唑浓度为300 mM时被洗脱下来, 纯化效果相对较好, 可以进行后续实验。

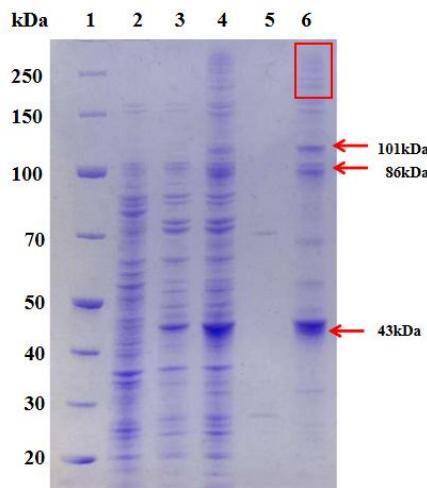


图44 Titin-4Ig聚合物纯化
Fig.44 Titin-4Ig polymer purification

注: 沸道1: Marker 26630, 沸道2: pTIG-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液, 沸道3: 穿透液, 沸道4: 上清液, 沸道5: 50 mM咪唑洗脱液, 沸道6: 300 mM咪唑洗脱液

3.4.2 体积排阻色谱法鉴定 (SEC)

将经过纯化的Titin-4Ig蛋白单体、Titin-4Ig聚合物以及蛋白标准品按照与3.2.1完全相同的上样、洗脱条件通过SEC色谱柱, 通过蛋白的洗脱时间计算蛋白大小, 结果如图45。根据液相色谱结果表明Titin-4Ig聚合物聚合度范围约为一到十左右, 其中四聚物到八聚物占比最多, 在与分子量最大的标准品蛋白(640 kDa)相同的出峰时间处, 有显著的蛋白峰, 说明存在分子量超过640 kDa的高聚合度Titin-4Ig聚合蛋白, 这些都证明了我们利用断裂内含肽自剪切功能成功拼接出了Titin-4Ig多聚物。

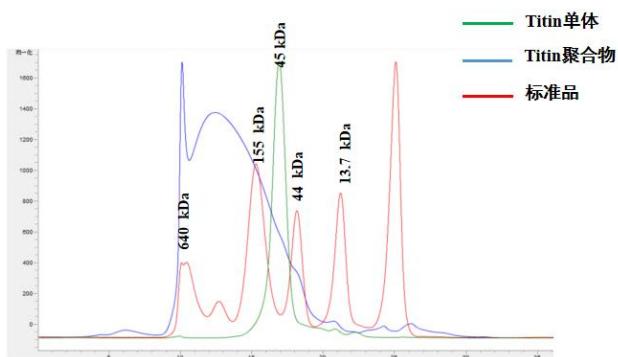


图45 单体、聚合物和标准品的SEC A280色谱图
Fig.45 SEC A280 chromatograms for monomer polymer and MW standards
注: 色谱柱: Protein-Pak SEC Column, 300A, 10 μ m, 7.5 mm \times 300 mm, 洗脱条件: 含200 mmol/L NaCl和20 mmol/L PBS缓冲液(pH7.0), 流速为0.5 mL/min, 上样体积100 μ L, 上样量200 μ g, 检测波长280nm

3.4.3 Western blot鉴定

利用制备的多克隆抗体进一步对纯化的Titin-4Ig聚合物进行Western Blot鉴定, 结果如图46所示。Titin-4Ig聚合物纯化产物经Western Blot显示出不同大小的特异性条带, 与前面SDS-PAGE电泳条带相对应, 说明亲和层析纯化的蛋白都是Titin-4Ig聚合物(图46A)。进而通过制备电泳胶回收分子量>80 kDa的Titin-4Ig聚合物进行Western Blot鉴定, 结果条带大小及分布与预期相符, 这也进一步证实了我们已经成功拼接出Titin-4Ig大分子聚合物(图46B)。

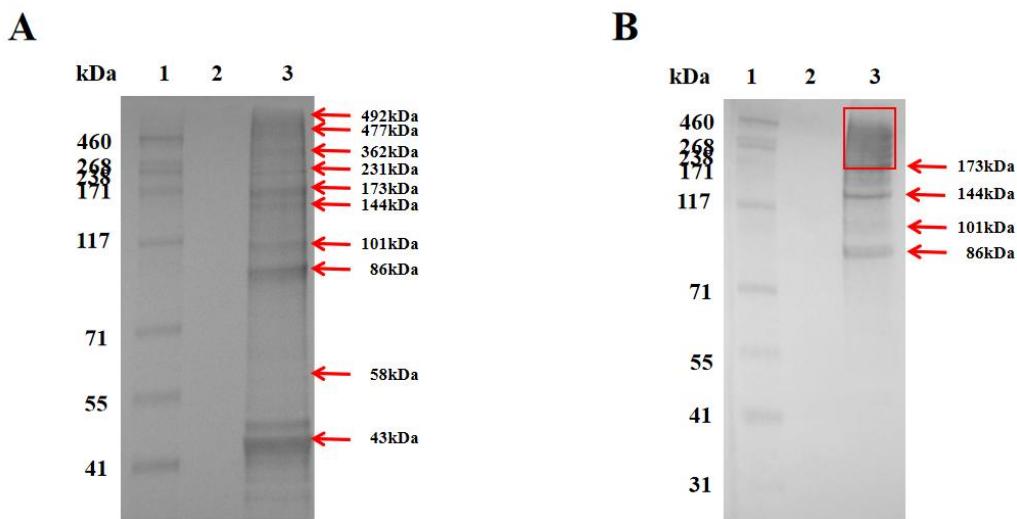


图46 Titin-4Ig聚合物Western Blot鉴定

Fig.46 Titin-4Ig polymer Western Blot identification

注: 图A, 池道1: Marker LC5699, 池道2: pTIG-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液, 池道3: Titin-4Ig聚合物纯化产物; 图B, 池道1: Marker LC5699, 池道2: pTIG-Int-Titin-4Ig/BL21(DE3)未诱导菌液, 池道3: Titin-4Ig聚合物制备电泳胶回收产物

4 讨论

大自然能够通过低能耗的方式生产出许多可生物降解的、高性能的材料，这些天然材料的性能甚至优于现有的人造替代品。但是，这些高性能的天然材料数量非常有限，很难从天然来源中大量获得。随着合成生物学的飞速发展，利用合成生物学的策略来促进这些高性能可再生材料的生产和开发就成为了一种极具潜力的方式。许多研究证实，由于这些天然蛋白质具有超高的分子量，蛋白序列也具有高度的重复性，而这些特性决定了材料的机械性能，所以利用蛋白单体通过内含肽拼接的方式表达得到蛋白高聚物，不仅可以解决超高分子量蛋白表达困难的问题，也可以进一步提高蛋白聚合度，实现生物材料机械性能的进一步提升。

在利用断裂内含肽自剪切形成聚合物的过程中，对于所拼接蛋白元件的选择具有一定要求，必须保证所选元件足够的结构刚性，避免发生自身的环化。本实验虽然已经挑选了结构具有相对刚性的肌联蛋白Titin-4Ig作为单体元件，在拼接过程中大部分的Titin-4Ig单体也在内含肽的剪切作用下形成聚合物，但还是有一定比例的单体发生自身环化，影响了Titin-4Ig聚合物的产量和聚合度。

针对环化的问题，后期考虑可以通过以下两种方式进行优化。一是利用“种子链生长”策略减少环化的现象，主要是将内含肽的一端利用一个小蛋白封堵起来作为种子，先诱导表达种子蛋白到达一定数量后，再诱导两端含有内含肽的正常蛋白表达；二是通过筛选能够进行正交分裂的断裂内含肽，分别构建两端含有不同断裂内含肽的片段，进行模块化组装。

为进一步提高聚合度，可以尝试通过断裂内含肽体外的自剪切拼接，对断裂内含肽在体内的拼接温度、pH值、金属离子浓度等相关影响因素进行探索，确定最佳剪切条件，提升拼接效率。同时也可构建二体、三体或四体表达质粒，提升拼接的单体大小。本论文在二体之间采用刚性连接肽(EAAAK)₃和柔性连接肽(GGGGS)₃两种连接方式，根据Titin-4Ig聚合物表达效果判断，两种方式虽然能够提高蛋白聚合度，但对蛋白表达水平没有显著地促进效果，且两种方式之间无明显差异。后续可以尝试调整连接肽的序列数，减短或延长连接肽的长度，也可以尝试使用更多种类连接肽，对其效果进行对比，确定最佳连接方式。

5 结论

实验室前期截取了兔比目鱼肌肌联蛋白中一段含有四个免疫球蛋白结构域组成的刚性片段 (Titin-4Ig)，将断裂内含肽gp41-1的N端和C端序列添加到Titin-4Ig两端，构建成为Int-Titin-4Ig重组基因序列，并在大肠杆菌中成功表达。本论文在此工作基础上，针对缺乏鉴定方法、Titin-4Ig聚合物表达水平低、包涵体比例高以及聚合度低等问题，开展了抗兔肌联蛋白的多克隆抗体的制备、Titin-4Ig聚合物的表达水平、表达形式和聚合度优化、Titin-4Ig聚合物纯化、Western Blot及HPLC鉴定等研究，主要取得以下成果：

(1) 制备了抗兔肌联蛋白的兔多抗。设计特异性引物，扩增目的基因Int-Titin-4Ig，构建pET22b-Titin-4Ig表达质粒，在大肠杆菌BL21(DE3)中成功表达Titin-4Ig单体；利用亲和层析进行纯化，得到纯度为90%以上、浓度为3.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、总量为10 mg的Titin-4Ig蛋白；使用纯化的Titin-4Ig蛋白作为抗原免疫兔，制备了效价为1:128000、Western Blot灵敏度为20 ng、具有良好特异性的兔多抗，可以用于后续Titin-4Ig聚合物的鉴定。

(2) 完成了对Titin-4Ig聚合物表达形式以及表达水平的优化。将Int-Titin-4Ig基因连入带有冷休克启动子的pCold II质粒经15℃低温诱导表达，结果显示Titin-4Ig聚合物主要以可溶形式表达；将其构建至pTIG质粒与硫氧还蛋白共表达，结果发现Titin-4Ig聚合物表达水平增加且可溶性表达比例在95%以上；在Trx共表达基础上通过正交实验，最终确定20℃、0.5 mM IPTG和24 h为最佳表达条件。通过BioBrick方式构建了由刚性或柔性接头连接的2个Titin-4Ig蛋白串联表达质粒，结果表明可有效地提升Titin-4Ig聚合度。

(3) 纯化了Titin-4Ig聚合物并进行了HPLC及Western Blot鉴定。通过亲和层析的方式纯化了Titin-4Ig聚合物；HPLC法检测结果显示，Titin-4Ig聚合物以四聚体至八聚体为主，最高聚合度可达到十以上，分子量超过600 kDa；利用制备的兔多抗进行Western Blot鉴定，结果表明可特异性显示不同分子量的条带，对应于不同聚合度的Titin-4Ig聚合物。

参考文献

- [1] 丁明珠, 李炳志, 王颖, 等.合成生物学重要研究方向进展[J].合成生物学, 2020, 1(1):7-28.
- [2] Hud N, Lynn D G. From life's origins to a synthetic biology[J]. Curr Opin Chem Biol, 2004, 8(6):627-628.
- [3] Wagner, Hanna J, Sprenger, et al. Upgrading biomaterials with synthetic biological modules for advanced medical applications[J]. Adv. Drug Delivery Rev., 2016, 105:77-95.
- [4] Abil Z, Xiong X, Zhao H. Synthetic biology for therapeutic applications[J]. Mol Pharm, 2015, 12(2):322-331.
- [5] Tyagi, Ashish, Kumar, et al. Synthetic Biology: Applications in the Food Sector[J] Crit Rev Food Sci Nutr, 2016, 56(9/12):1777-1789.
- [6] Mackenzie A. Synthetic biology and the technicity of biofuels[J]. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci, 2013, 44(2): 190-198.
- [7] Liu Z, Wang J, Nielsen J. Yeast synthetic biology advances biofuel production[J]. Curr Opin Microbiol, 2022, 65:33-39.
- [8] Wang Y, Demirer G S. Synthetic biology for plant genetic engineering and molecular farming[J]. Curr Trends Biotechnol, 2023, 41(9):1182-1198.
- [9] Kim B, Oh D, Kim S, et al. Mussel-mimetic protein-based adhesive hydrogel[J]. Biomacromolecules, 2014, 15(5):1579-1585.
- [10] 张玉晴, 马黄如, 程诗萌. 蛛丝蛋白研究进展[J]. 生物学教学, 2011, 36(2):7-8.
- [11] Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(4):1514-1524.
- [12] Jessica F, Almine Daniel V, Bax Suzanne M. Elastin-based materials[J]. Chem Soc Rev, 2010, 39(9):3371-3379.
- [13] Ramshaw John A, Peng Y, Glattauer Veronica, et al. Collagens as biomaterials[J]. J Mater Sci: Mater Med, 2008, 20(Suppl 1).
- [14] Yuvienco C, More H, Haghpanah J, et al. Modulating supramolecular assemblies and mechanical properties of engineered protein materials by fluorinated amino acids[J]. Biomacromolecules, 2012, 13(8):2273-2278.
- [15] Choi S, Chaudhry P, Zo S, et al. Advances in Protein-Based Materials: From Origin to Novel Biomaterials[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1078:161-210.
- [16] Ronald W. Nunes, John R. Martin, Julian F. Johnson. Influence of molecular weight and molecular weight distribution on mechanical properties of polymers[J]. Polym Eng Sci, 1982, 22(4):205-228.
- [17] Spiess K, Lammel A, Scheibel T. Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials[J]. Macromol Biosci, 2010, 10(9): 998-1007.
- [18] Sionkowska A. Collagen blended with natural polymers: recent advances and trends[J]. Prog Polym Sci, 2021, 122: 101452.
- [19] Bessa P, Balmayor E, Hartinger J, et al. Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant bone morphogenetic protein-2: *in vitro* and *in vivo* bioactivity[J]. Tissue Eng, Part C, 2010, 16(5): 937-945.
- [20] Macewan S, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers[J]. Biopolymers, 2010, 94(1): 60-77
- [21] Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(9):679-689.
- [22] Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity[J]. Science, 1995, 270(5234): 293-296.
- [23] Bang M, Centner T, Fornoff F, et al. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system[J]. Circ Res, 2001, 89(11): 1065-1072.
- [24] Djulbegovic M, Uversky V, Karp C, et al. Functional impact of titin (TTN) mutations in ocular surface squamous neoplasia[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 195:93-101.
- [25] Walter Herzog. The multiple roles of titin in muscle contraction and force production[J]. Biophys Rev, 2018, 10(4): 1187-1199.
- [26] Gregorio C, Granzier H, Sorimachi H, et al. Muscle assembly: a titanic achievement [J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(1): 18-25.
- [27] Gautel M, Djinović-Carugo K. The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion [J]. J Exp Biol, 2016, 219(Pt 2):135-145.

- [28] Bang M, Mudry R, McElhinny A, et al. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(2):413-427.
- [29] Rivas-Pardo J, Eckels E, Popa I, et al. Work Done by Titin Protein Folding Assists Muscle Contraction[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(6): 1339-1347.
- [30] 郭春杰, 于亮, 李彦锦, 等. 肌联蛋白: 结构、亚型分类及功能调节[J]. 生理学, 2023, 75(04):544-554.
- [31] Lv S, Dudek D, Cao Y, et al. Designed biomaterials to mimic the mechanical properties of muscles[J]. *Nature*, 2010, 465(7294):69-73.
- [32] Bowen C, Sargent C, Wang A, et al. Microbial production of megadalton titin yields fibers with advantageous mechanical properties[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):5182-5193.
- [33] Perler F, Xu M, Paulus H. Protein splicing and autoproteolysis mechanisms[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1(3):292-299.
- [34] Duan X, Gimble F, Quiocho F A. Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity[J]. *Cell*, 1997, 89(4):555-564.
- [35] Perler F B. InBase, the Intein Database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 344-345.
- [36] 黄晨燕, 郑茹萍, 李美娜, 等. 内含肽的功能与研究进展[J]. 农业开发与装备, 2017, (7):36-84.
- [37] Yang J, Meng Q, Liu X Q. Intein harbouring large tandem repeats in replicative DNA helicase of *Trichodesmium erythraeum*[J]. *Mol Microbiol*, 2004, 51(4):1185-1192.
- [38] Cooper A, Stevens T H. Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level[J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20(9):351-356.
- [39] Waters E, Hohn M, Ahel I, et al. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(22):12984-12988.
- [40] Liu X Q. Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution[J]. *Annu Rev Genet*, 2000, 34: 61-76.
- [41] Mills, Kenneth, Reitter, et al. Nicastri, Michael, et al. The Variations Of Protein Splicing: Regulation And Mechanism Of Non-Canonical Inteins[J]. *Adv Protein Pept Sci*, 2014, 23:165-166.
- [42] Wu H, Hu Z, Liu X Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(16):9226-9231.
- [43] Shingledecker K, Jiang S, Paulus H. Molecular dissection of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein: design of a minimal intein and of a trans-splicing system involving two intein fragments[J]. *Gene*, 1998, 207(2):187-195.
- [44] Lew B, Mills K, Paulus H. Protein splicing in vitro with a semisynthetic two-component minimal intein[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(26): 15887-15890.
- [45] Telenti A, Southworth M, Alcaide F, et al. The *Mycobacterium xenopi* GyrA protein splicing element: characterization of a minimal intein[J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(20):6378-6382.
- [46] Southworth M, Adam E, Panne D, et al. Control of protein splicing by intein fragment reassembly[J]. *EMBO J*, 1998, 17(4):918-926.
- [47] Saleh L, Perler FB. Protein splicing in cis and in trans[J]. *Chem Rec*, 2006, 6(4):183-193.
- [48] Ozawa T, Sako Y, Sato M, et al. A genetic approach to identifying mitochondrial proteins[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 287-293.
- [49] Xu M, Perler F B. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation[J]. *EMBO J*, 1996, 15(19):5146-5153.
- [50] 张静, 刘环, 周晶, 等. 通过断裂内含肽介导的反式剪接合成大的蛋白[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 74-78.
- [51] Iwai H, Lingel A, Pluckthun A. Cyclic green fluorescent protein produced in vivo using an artificially split PI-PfuI intein from *Pyrococcus furiosus*[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(19):16548-16554.
- [52] Dawson P, Kent S B. Synthesis of native proteins by chemical ligation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69:923-960.
- [53] Johnson E, Malito E, Shen Y, et al. Modular total chemical synthesis of a human immunodeficiency virus type 1 protease[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(37): 11480-11490.
- [54] Brea R, Cole C, Devaraj N K. In situ vesicle formation by native chemical ligation[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(51):14102-14105.
- [55] Giesler RJ, Erickson PW, Kay MS. Enhancing native chemical ligation for challenging chemical protein syntheses[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 58: 37-44.

-
- [56] Rodon Fores J, Martinez Mendez M, Mao X, et al. Localized Supramolecular Peptide Self-Assembly Directed by Enzyme-Induced Proton Gradients[J]. *Angew Chem*, 2017, 56(50): 15984-15988.
 - [57] Heck T, Faccio G, Richter M, et al. Enzyme-catalyzed protein crosslinking[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(2): 461-475.
 - [58] van 't Hof W, Hansenová Maňásková S, Veerman E, et al. Sortase-mediated backbone cyclization of proteins and peptides[J]. *Biol Chem*, 2015, 396(4):283-293.
 - [59] Wang H, Altun B, Nwe K, et al. Proximity-Based Sortase-Mediated Ligation[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(19):5349-5352.
 - [60] Aranko A, Wlodawer A, Iwaï H. Nature's recipe for splitting inteins[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2014, 27(8): 263-271.
 - [61] Sarmiento C, Camarero J A. Biotechnological Applications of Protein Splicing[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(5):408-424.