第 40 卷 第 1 期
2025 年 2 月

天津科技大学学报
Journal of Tianjin University of Science and Technology

Vol. 40 No. 1
Feb. 2025

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20240034
网络首发日期：2024–07–12；网络首发地址：http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240709.1916.001

基于 Split-GFP 系统定量分析大肠杆菌中异源表达的类胶原蛋白 Scl2

色依德·斯马依[1]，赵晨旭[1]，张轶群[1]，刘业学[2]，王稳航[2]，李 玉[1]
（1. 工业发酵微生物教育部重点实验室，天津科技大学生物工程学院，天津 300457；
2. 天津科技大学食品科学与工程学院，天津 300457）

摘 要：利用大肠杆菌（*Escherichia coli*）表达类胶原蛋白 Scl2，并通过 Split-GFP 系统建立一种简便、快速且可定量检测 Scl2 的方法。结果表明，Scl2 在大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21（DE3）中成功表达，并通过 His 亲和标签纯化得到较高纯度的 Scl2。圆二色光谱和差示扫描量热仪分析发现，Scl2 的二级结构和热稳定性与动物源Ⅰ型胶原蛋白相似，并且 GFP11 的融合对其几乎没有影响。GFP1-10 和 Scl2-GFP11 结合的前 20 h 的结合速度较高，达到最大相对荧光强度需要约 70 h。当两者结合 1 h 时，Scl2-GFP11 蛋白质量浓度与相对荧光强度之间能够形成较好的线性关系，相关系数 R^2 为 0.999 5，重复性良好。本研究利用 Split-GFP 系统建立了体外检测并定量分析 Scl2 的方法，为下一步高通量筛选研究提供了快速、简便的工具。

关键词：大肠杆菌；异源表达；类胶原蛋白 Scl2；Split-GFP；蛋白定量分析
中图分类号：Q816 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-6510（2025）01-0013-07

Quantitative Analysis of Collagen-Like Protein Scl2 Heterologously Expressed in *Escherichia coli* Based on Split-GFP System

SIMAYI Seyide[1]，ZHAO Chenxu[1]，ZHANG Yiqun[1]，LIU Yexue[2]，WANG Wenwang[2]，LI Yu[1]
（1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology，Ministry of Education，College of Biotechnology，Tianjin University of Science and Technology，Tianjin 300457，China；
2. College of Food Science and Engineering，Tianjin University of Science and Technology，Tianjin 300457，China）

Abstract：In the current study，Scl2 was expressed in *Escherichia coli* BL21（DE3），and a simple and efficient detection method was also established for quantitative analysis of Scl2 through the Split-GFP system. The results indicated that Scl2 was successfully expressed in *E. coli* BL21（DE3）and purified with the use of His affinity label，resulting in high purity Scl2. CD spectroscopy and DSC analysis demonstrated that the secondary structure and thermal stability of Scl2 were comparable to those of animal-derived type Ⅰ collagen. The presence of GFP11 had minimal impact on these properties. The first 20 hours of binding between GFP1-10 and Scl2-GFP11 showed a high binding rate and it took about 70 hours to reach the maximum fluorescence intensity. After 1 hour of binding，a positive linear relationship was observed between the concentration of Scl2-GFP11 protein and fluorescence intensity. The correlation coefficient R^2 was calculated to be 0.999 5，indicating excellent repeatability. Therefore，we successfully established a method for in vitro detection and quantitative analysis of Scl2 using the Split-GFP system，which has provided a fast and convenient tool for future high-throughput screening research.

Key words：*Escherichia coli*；heterologous expression；collagen-like protein Scl2；Split-GFP；protein quantitative analysis

收稿日期：2024–02–29；**修回日期**：2024–03–12
基金项目：国家重点研发计划项目（2023YFF1103901）
作者简介：色依德·斯马依（1998—），女（维吾尔族），新疆维吾尔自治区喀什人，硕士研究生；**通信作者**：李 玉，教授，liyu@tust.edu.cn

引文格式：
色依德·斯马依，赵晨旭，张轶群，等. 基于 Split-GFP 系统定量分析大肠杆菌中异源表达的类胶原蛋白 Scl2[J]. 天津科技大学学报，2025，40(1)：13-19.
SIMAYI S Y D，ZHAO C X，ZHANG Y Q，et al. Quantitative analysis of collagen-like protein Scl2 heterologously expressed in *Escherichia coli* based on Split-GFP system[J]. Journal of Tianjin university of science and technology，2025，40(1)：13-19.

胶原蛋白在哺乳动物中含量丰富，是食品[1]、化妆品[2-3]、生物医学用品[4-5]和生物工程应用[6]中的重要材料。然而，动物源胶原蛋白存在过敏原问题、动物福利问题以及涉及宗教信仰的顾虑。近年来，在分析微生物基因组数据库后，研究人员发现很多细菌含有大量 Gly-Xaa-Yaa(GXY)重复序列的三螺旋胶原样蛋白的基因[7]，其中来源于化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的类胶原蛋白 Scl2 成为研究的模型蛋白。Scl2 主要由 3 个主要结构域组成[8]：N 端的 V 结构域、胶原结构域和 C 端的附着结构域。虽然 Scl2 不含羟脯氨酸，但它可以通过带电氨基酸之间形成的分子间盐桥稳定其三螺旋结构[9]。与胶原蛋白类似，Scl2 在 35 ~ 39 ℃有较高的热稳定性[10]，其生产成本低[11-12]，具有大规模生产的潜在能力，且无细胞毒性和免疫原性[13]，具备生物安全性。Scl2 还具有良好的生物相容性，并可以作为引入各种功能序列的“白纸”模板[14-15]，例如在胶原结构域中引入整合素、肝素和 MMP 切割位点等具有特定功能的序列，可构建重组蛋白，满足生物医学的要求。因此，Scl2 被视为有前景的生物材料[16-17]。

重组蛋白的检测和定量分析是生物合成过程中的关键一环，需要一种准确测定类胶原蛋白含量的方法。Scl2 无生物活性[13]，同时不含羟脯氨酸，通常通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白表达量[18-20]。然而，该方法特异性较差，并且无法方便、快速地实时监控体外或体内的类胶原蛋白表达水平。因此，建立一种快速、简便的类胶原蛋白 Scl2 定量检测方法对于其后续的制备与应用至关重要。GFP 是一种常见的报告蛋白，具有结构稳定、灵敏度高以及生色团形成无物种特异性等优点[21]，被广泛应用于基因表达调控研究以及蛋白质的定位、转移和相互作用的研究。然而，完整 GFP 相对分子质量大、空间位阻效应强，可能会阻碍蛋白质三维结构的形成。同时，GFP 的持久荧光通常会干扰其他标签的检测，极可能会对后期应用产生影响。Split-GFP 系统是近些年发展的一种较理想的检测手段，在体内和体外都能提供敏感的分析信号，而且不需要外部化学试剂或底物，也不会改变目的蛋白的溶解度[22-23]。它是由 GFP1-10 和 GFP11 组成，其中 GFP11 具有相对分子质量小、能够自发组装和可溶性强的特点。Split-GFP 系统受干扰因素较少，对目的蛋白的影响也较小，突变文库/蛋白质文库的假阳性程度低，适用于重组蛋白生产的检测、定量和在线监测，以及在单细胞水平上分析生产的异质性和细胞内的定位[24]。在 Split-GFP 系统中，目的蛋白通过 Linker 融合到小分子量的 GFP11 片段(β 链 11，残基 215—230)上，而 GFP1-10 片段(β 链 1-10，残基 1—214)则单独表达。这两个片段本身均不发出荧光，但同时存在时能够自发组装形成 GFP[23]。Cabantous 等[25]证明了 Split-GFP 系统能够在体外准确地检测不同蛋白质的含量。Javier 等[26]通过 Split-GFP 的方法实现了蛋白质工程文库的高通量筛选。Jackrel 等[27]报道了 Split-GFP 可用于筛选蛋白质文库，以识别与选定的肽序列特异性结合的蛋白质。Zhang 等[28]则利用 Split-GFP 检测了秀丽隐杆线虫特殊细胞中几个基因的组合启动子活性。

目前，尚没有使用 Split-GFP 系统检测 Scl2 含量的研究报道。本研究将来源于 *S. pyogenes* 的 Scl2 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)中进行异源表达，利用 Ni-NTA 亲和层析进行目的蛋白纯化，并对其二级结构和热稳定性进行分析，建立了基于 Split-GFP 系统的 Scl2 检测方法，将 GFP11 与 Scl2 融合表达，同时单独表达 GFP1-10 蛋白，将纯化后的 GFP11 与 Scl2 融合蛋白作为检测液，与过量的 GFP1-10 蛋白混合，测定相对荧光强度，从而表征表达的 Scl2 蛋白含量(图 1)。通过研究 GFP11 对 Scl2 的二级结构和热稳定性产生的影响以及探索 Scl2 蛋白质量浓度和荧光强度之间的关联曲线，衡量检测体系的可行性。本研究为类胶原蛋白高特异性、高灵敏度、高效能的体外定量分析方法的建立提供了一定的依据。

图 1　Scl2-GFP11 与 GFP1-10 结合的原理示意图
Fig. 1　Schematic diagram of combination of Scl2-GFP11 and GFP1-10

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株与质粒

本研究使用的菌株和质粒详见表 1。*S. pyogenes* 来源的 *scl2* 基因序列根据大肠杆菌密码子偏好性进行了密码子优化。基因合成工作由北京六合华大基因科技有限公司完成。扩增引物合成及扩增产物测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

表 1　菌株和质粒

Tab. 1　Strains and plasmids

名称	来源
E. coli T1	实验室保存
E. coli BL21(DE3)	实验室保存
E. coli BL21(DE3)/pET28a(+)/*scl2*	本研究
E. coli BL21(DE3)/pET28a(+)/*scl2-gfp11*	本研究
E. coli BL21(DE3)/pET28a(+)/*gfp1-10*	本研究
pET28a(+)	实验室保存
pET28a(+)/*scl2*	本研究
pET28a(+)/*scl2-gfp11*	本研究
pET28a(+)/*gfp1-10*	本研究

1.1.2　主要试剂与仪器

DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶，TaKaRa 公司；无缝克隆，北京全式金生物技术有限公司；质粒提取试剂盒、DNA 切胶回收试剂盒，Omega 公司；卡那霉素、考马斯亮蓝 R–250、蛋白预制胶、异丙基–*β*–*D* 硫代半乳糖苷(IPTG)、苯基甲基磺酰氟(PMSF)、溶菌酶等，北京索莱宝科技有限公司。

LB 培养基：酵母粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，固体培养基含琼脂糖 2 g/L，配制完成后 121 ℃灭菌 20 min。卡那霉素作为大肠杆菌抗性筛选时，终质量浓度为 1 μg/mL。

MOS–450 型圆二色光谱仪，法国 Biologic 公司；DSC 3500 Sirius 型差示扫描量热仪，德国 NETZSCH 公司；Infinite 200 PRO 型酶标仪，奥地利 TECAN 公司。

1.2　方法

1.2.1　重组工程菌的构建

GFP11 由 16 个氨基酸序列(RDHMVLHEYVNAAGIT)组成，该序列通过 Linker(LIGSDGGGSTS)连接到目的蛋白。将 pET28a(+)/*scl2* 质粒用 *Xho* Ⅰ单酶切，并纯化回收，获得线性载体；扩增 *linker-gfp11* 基因，并纯化回收目的产物，通过无缝克隆酶与线性载体连接，得到重组质粒 pET28a(+)/*scl2-gfp11*，并通过热激法转化至 T1 感受态细胞中，涂布于含 1 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板，于 37 ℃过夜培养后进行菌落 PCR 验证，把测序验证正确的菌株命名为 *E. coli* T1/pET28a(+)/*scl2-gfp11*，再提取质粒，转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。

1.2.2　重组工程菌的发酵培养

挑取重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)/*scl2-gfp11* 单菌落接入 LB 液体培养基中，以 2%接种量转接于 250 mL LB 培养基中，37 ℃摇瓶培养 2 ~ 3 h，达到对数期 A_{600} = 0.8 后，加入 IPTG 诱导，16 ℃培养 20 h。

1.2.3　SDS-PAGE 分析

将发酵液 8 000 r/min 离心 10 min，收集细胞，洗涤 3 次，并重悬于 lysis 缓冲溶液(20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.4，500 mmol/L NaCl，0.154 g DTT，20 mmol/L 咪唑)中。使用超声处理悬浮细胞 20 min，在 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 30 min 后取上清液，加入 loading buffer 后煮沸 10 min。电泳条件：上样量为 20 μL，在电泳电压 120 V 条件下运行 1.5 h，用考马斯亮蓝 R–250 染色 1 ~ 2 h，用脱色液脱色 2 h。

1.2.4　类胶原蛋白 Scl2 的纯化

通过离心收集细胞后，将细胞重悬于含有 1%溶菌酶和 100 mmol/L PMSF 的 lysis 缓冲溶液中。将细胞超声处理 20 min 后，4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min，再将上清液经 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤。随后上样到重力流镍亲和柱(Ni-NTA)中。用含不同咪唑浓度的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.4，500 mmol/L NaCl，0.154 g DTT，咪唑分别为 100 mmol/L、300 mmol/L、500 mmol/L)梯度洗脱吸附的蛋白质。将洗脱的蛋白质溶液装入超滤管(截留相对分子质量 1×10^4)中超滤浓缩，然后用 PBS 缓冲液(0.01 mol/L，pH 7.4)超滤置换，以除去洗脱液中的咪唑，最后冷冻干燥，置于–20 ℃冻存。

1.2.5　圆二色光谱(CD)分析

将 10 mg 纯化冻干后的 Scl2 固体粉末溶于 PBS 缓冲液(pH 7.4)中，用 1 mm 光径的石英池进行光谱检测。参数设置：温度 25 ℃，扫描波长范围为 190 ~ 260 nm，重复 3 次。

1.2.6　差示扫描量热仪(DSC)分析

将 3 mg Scl2 冻干粉末放入铝制坩埚中，用压样机压制，以空铝制坩埚为对照。温度从 15 ℃加热至 200 ℃，升温速率为 10 ℃/min。

1.2.7　利用 Split-GFP 系统检测类胶原蛋白 Scl2 的含量

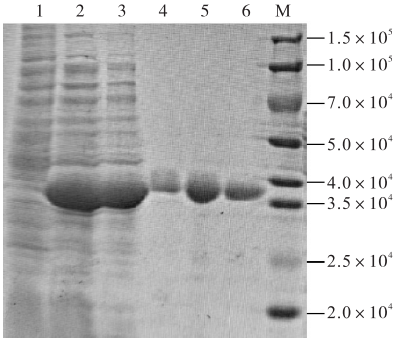
复性及纯化 GFP1-10 的操作步骤参考 Cabantous

等[25]和 Javier 等[26]的方法。在 96 黑色荧光孔板中，加入一定量的样品与检测液 GFP1-10 混合，每隔一定时间用酶标仪检测相对荧光强度，激发波长为 488 nm，发射波长为 530 nm。

2　结果与分析

2.1　类胶原蛋白 Scl2 的表达及其纯化

将 *scl2* 基因构建到质粒 pET28a(+)中，然后转化到 *E. coli* BL21(DE3)中，并在 250 mL 摇瓶中发酵培养重组工程菌株。将不含 *scl2* 基因的 BL21(DE3)/pET28a(+)菌株作为阴性对照。对收集的细胞进行超声破碎处理，并用 SDS-PAGE 验证表达情况。与阴性对照相比，观察到 1 条相对分子质量约为 3.61×10^4 的蛋白条带，与理论预期值大小一致，如图 2 所示。这表明 Scl2 在重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)/*scl2* 中成功表达。



1. 阴性对照 pET28a(+)/BL21(DE3)菌株细胞破碎后的上清液；2. *scl2*/pET28a(+)/BL21(DE3)菌株细胞破碎后的上清液；3—5. 分别为 100、300、500 mmol/L 咪唑洗脱液；6. 超滤浓缩并 PBS 置换后的蛋白液。

图 2　Scl2 在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达及纯化结果

Fig. 2　Expression and purification of Scl2 in *E. coli* BL21(DE3)

Scl2 的 N 端融合了 6×His 镍柱亲和标签，该标签能够与镍特异性结合，并通过改变洗脱液中咪唑梯度将目的蛋白洗脱下来，从而达到纯化的目的。采用 Ni-NTA 亲和层析对 Scl2 进行了纯化，并利用 SDS-PAGE 验证蛋白质纯度。纯化过程中蛋白样品的电泳条带如图 2 所示。由图 2 可知，含有 100 mmol/L 和 300 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液不能够将目的蛋白洗脱下来，当咪唑浓度增加到 500 mmol/L 时，可以获得单一的条带，几乎没有杂蛋白存在。此外，它的相对分子质量与目的蛋白的相对分子质量大小一致，表明使用该纯化方法可以获得较高纯度的类胶原蛋白。

2.2　类胶原蛋白 Scl2 的二级结构及热稳定性分析

圆二色光谱是分析测定蛋白质结构变化非常灵敏的光谱技术之一[29]。胶原结构域的三股螺旋结构的 CD 光谱图的特征吸收峰是 215～227 nm 范围内的正吸收峰和 200 nm 左右的负吸收峰[30]。为评估胶原结构域的二级结构，使用圆二色光谱仪对 Scl2 进行 190～260 nm 波长范围内的扫描，结果如图 3 所示。最大峰值出现在 220 nm 处，为正吸收峰，而最小峰在 202 nm 处，为负吸收峰，与 Merrett 等[31]的研究结果一致，这表明 Scl2 具有胶原结构域的三螺旋结构特征。

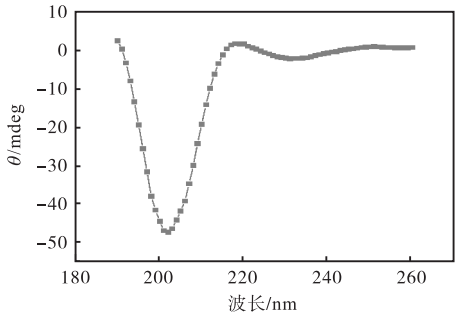


图 3　类胶原蛋白 Scl2 的二级结构分析

Fig. 3　Secondary structure analysis of collagen-like protein Scl2

差示扫描量热仪可以检测胶原蛋白样品的焓变(ΔH)。样品中的吸热峰与三螺旋的构象修饰和破坏有关，对应于胶原纤维的变性，其峰值温度代表最大转变温度(T_m)。吸热峰的峰值温度 T_m 与焓变和抗变性能力成正比[32]。本研究使用 DSC 对 Scl2 进行了热稳定性分析，结果如图 4 所示。

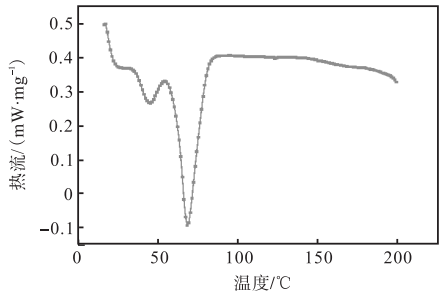


图 4　类胶原蛋白 Scl2 的热稳定性分析

Fig. 4　Thermal stability analysis of collagen-like protein Scl2

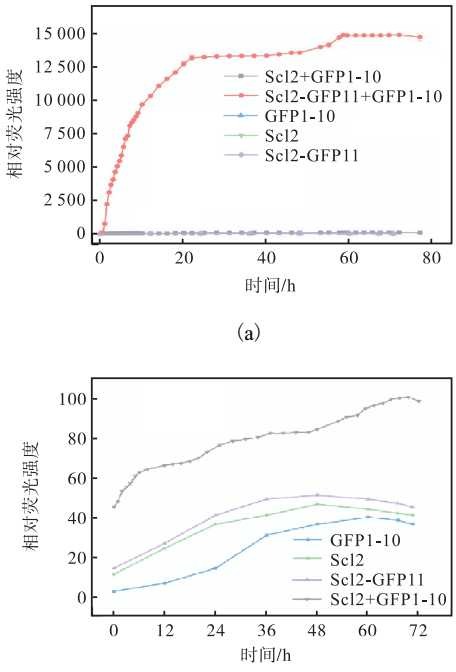
当温度升高到 40 ℃时，出现 1 个次级峰，这可能是由于该温度可破坏维持亚稳态簇较弱的非特异性分子间相互作用。随着温度逐渐升高，在 68.9 ℃时出现 1 个明显的吸热峰，显示出尖锐的热转变，说明发生了热变性。这意味着三螺旋结构展开成 1 个随

机的线圈，造成胶原蛋白的独特特征丧失[28]，与 Shoulder 等[33]的研究结果一致。研究发现，胶原蛋白的 T_m 与其结构密切相关，端肽胶原蛋白的 T_m 可增加至 79.27 ℃[34]，而胶原蛋白肽重复单元不同，其热稳定性也存在显著差异[35]。

2.3　利用 Split-GFP 测定类胶原蛋白 Scl2 的含量

2.3.1　分裂绿色荧光蛋白 GFP1-10 和 Scl2-GFP11 的互补

将 GFP11 标签插入 Scl2 的 N 端，并使用 GFP 1-10 进行补充，即可快速自发组装生成新的荧光蛋白复合物。为了确定 GFP1-10（1.00 mg/mL）、Scl2-GFP11（1.00 mg/mL）和 Scl2（1.00 mg/mL）蛋白溶液本身是否有荧光，分别检测了它们的相对荧光强度（图 5）。结果显示，它们本身的相对荧光强度较弱，并且远远小于 GFP1-10 与 Scl2-GFP11 结合后形成的相对荧光强度，可以忽略不计。这说明形成发色团的残基在互补之前几乎不发出荧光。



(a)

(b) 图(a)的局部放大

图 5　Scl2-GFP11 和 GFP1-10 结合形成的荧光变化

Fig. 5　Fluorescence changes formed by combination of Scl2-GFP11 and GFP1-10

根据 Cabantous[25]等的方法，将 1.00 mg/mL Scl2-GFP11 与 1.00 mg/mL GFP1-10 蛋白溶液按体积比 1∶9 混合后，在 4 ℃条件下孵育。结果显示，相对荧光强度随时间增加而显著增加，可以推断 GFP1-10 和 Scl2-GFP11 能够互补并产生荧光。在反应开始的 20 h 内，显示出较高的结合速度，相对荧光强度达到 13 151.5；随着反应的继续进行（20 ~ 55 h），相对荧光强度增加幅度明显变小，说明结合速度逐渐变慢；反应 70 h 后，相对荧光强度达到最大（14 863），随后开始略有下降，这与 Javier 等[26]的研究结果相似。这表明 GFP1-10 与 Scl2-GFP11 混合后可以进行自组装，形成 Scl2-GFP 并产生强烈的荧光信号。因此，该系统可实现 Scl2 的检测。

2.3.2　GFP11 标签对类胶原蛋白 Scl2 的影响

GFP11 标签对 Scl2 的二级结构和热稳定性的影响如图 6 和图 7 所示。Scl2-GFP11 的圆二色光谱图显示（图 6），峰特征与 Scl2 一致（图 3），说明 GFP11 标签的添加不会改变 Scl2 的二级结构。Scl2-GFP11 的 DSC 曲线显示（图 7），其 T_m 为 68.9 ℃，与 Scl2 相同（图 4），说明 GFP11 的添加对 Scl2 的热稳定性也不会产生影响。

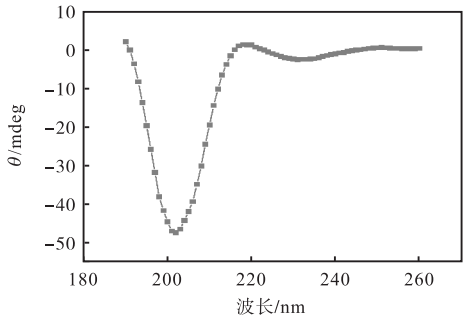


图 6　Scl2-GFP11 的二级结构分析

Fig. 6　Secondary structure analysis of Scl2-GFP11

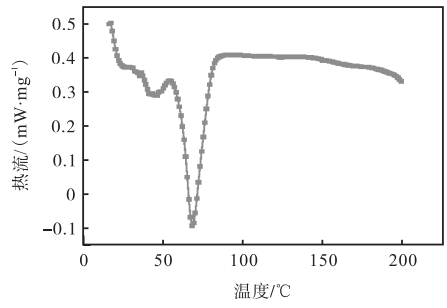


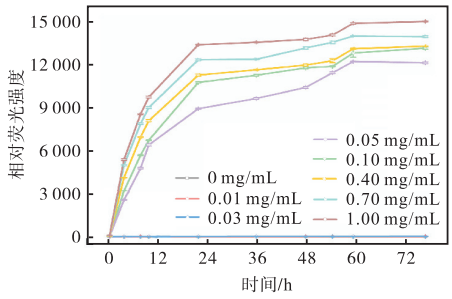
图 7　Scl2-GFP11 的热稳定性分析

Fig. 7　Thermal stability analysis of Scl2-GFP11

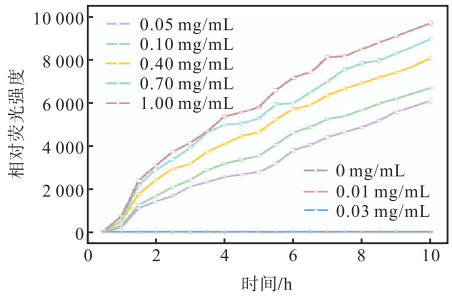
2.3.3　Scl2-GFP11 蛋白质量浓度和相对荧光强度之间的关系

为了找到蛋白质质量浓度和相对荧光强度之间的关系，测定了不同质量浓度的 Scl2-GFP11 与 GFP1-10 结合时的相对荧光强度随时间的变化。将质量浓度分别为 1.00、0.70、0.40、0.10、0.05、0.03、0.01 mg/mL 的 Scl2-GFP11 蛋白溶液，与质量浓度为 1.00 mg/mL 的 GFP1-10 按体积比 1∶9 混合。当

Scl2-GFP11 质量浓度为 0.01 ~ 0.03 mg/mL 时，相对荧光强度几乎不发生变化，与 Scl2-GFP11 质量浓度为 0 mg/mL 时的结果相似，这说明低质量浓度的 Scl2-GFP11 与 GFP1-10 结合形成的 Scl2-GFP 的量很少，导致几乎检测不到荧光信号。随着 Scl2-GFP11 质量浓度的增加，在 0.05 ~ 1.00 mg/mL 范围内，相对荧光强度与质量浓度呈现正比关系（图 8），尤其是在反应开始的最初 10 h，相对荧光强度呈现急剧增长的趋势〔图 8(b)〕，这与 Cabantous 等[25]的研究结果相似。



(a)



(b) 图(a)的局部放大

图 8　SCL2-GFP11 蛋白质量浓度和相对荧光强度之间的关系

Fig. 8　Relationship between Scl2-GFP11 protein concentration and fluorescence intensity

详细分析 0.8、0.7、0.6、0.5、0.4 mg/mL 的 Scl2-GFP11 溶液与 0.1 mg/mL GFP1-10 蛋白结合后相对荧光强度的相关系数在结合 1 ~ 10 h 内的变化，结果见表 2。

表 2　GFP1-10 与 Scl2-GFP11 结合时间与相关系数 R^2

Tab. 2　Binding time and correlation coefficient R^2 between GFP1-10 and Scl2-GFP11

结合时间/h	R^2	结合时间/h	R^2
1	0.999 5	3.5	0.932 3
1.5	0.985 6	4	0.984 6
2	0.986 8	6	0.940 1
2.5	0.985 8	8	0.982 4
3	0.955 3	10	0.981 1

从表 2 中可以看出，当 GFP1-10 与 Scl2-GFP11 结合时间为 1 h 时，蛋白质量浓度与相对荧光强度之间存在良好的线性关系，并利用 Origin 2018 拟合数据的线性回归曲线及方程，得到方程式 $y = 342.12x + 43.58$，相关系数 R^2 为 0.999 5（图 9）。

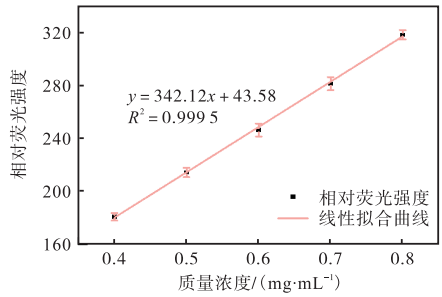


图 9　SCL2-GFP11 蛋白质量浓度与相对荧光强度之间的标准曲线

Fig. 9　Standard curve between Scl2-GFP11 protein concentration and fluorescence intensity

3　讨　论

在细菌基因组中鉴定出的胶原样蛋白的基因可以在细菌宿主中有效地重组表达，为获取胶原蛋白提供了一种有效的替代方法。化脓链球菌来源的类胶原蛋白 Scl2 与动物源胶原蛋白相似的三螺旋结构而引起广大研究人员的兴趣[7]。在本研究中，利用 *E. coli* BL21(DE3)对类胶原蛋白 Scl2 进行了异源表达，且重组蛋白产量达 100 mg/L。经过 His 亲和标签蛋白纯化和 SDS-PAGE 分析发现，纯化后的蛋白条带单一，没有其他杂蛋白，基于蛋白条带灰度估算出蛋白纯度约为 96.4%。通过 CD 光谱和 DSC 分析发现 Scl2 的二级结构呈现三螺旋结构且具有较高的热稳定性，与Ⅰ型胶原蛋白相似。

为了实时监测体外或体内 Scl2 的表达水平，本研究建立了一种特异性且方便快速的 Split-GFP 系统。GFP 由 11 条反平行的 β–链折叠形成的桶状蛋白，它的发色团位于桶的几何中心附近的 α–螺旋上。为了进一步拓展GFP的应用，研究人员对其进行了拆分，并通过循环重排技术发现了几种荧光互补蛋白[36]。其中，GFP1-10/GFP11 的荧光互补系统结合效果最好。在该系统中，GFP 的第 11 条 β 链(GFP11)中高度保守的 Glu222 与 GFP1-10 片段可以快速自组装后催化发色团成熟[37]。本研究建立的 Split-GFP 系统中，GFP1-10 与 Scl2-GFP11 能够互补形成荧光，且 GFP11 标签不改变 Scl2 的二级结构和热稳定性。GFP1-10 与 Scl2-GFP11 结合形成的荧光变化曲线显

示，在反应前 20 h 具有较高的结合速度，可以方便地实时监控 Scl2 的表达水平。当 Scl2-GFP11 质量浓度在 0.4 ~ 0.8 mg/mL 之间，结合时间为 1 h 时，Scl2-GFP11 蛋白质量浓度与相对荧光强度之间能够形成线性关系，由此建立了标准曲线，可用于计算出待测类胶原蛋白的质量浓度。虽然前期 GFP1-10 与 Scl2-GFP11 的结合过程中相对荧光强度迅速增加，但随后的结合速度逐渐减缓。这意味着达到最大相对荧光强度需要较长时间，因此在今后的研究中需要进一步提高结合效率。

综上所述，通过建立的 Split-GFP 系统，能够对 Scl2 的表达水平实现高特异性的快速实时监测和定量分析，因此为下一步的高通量筛选研究奠定良好的基础并提供可靠的工具。

参考文献：

[1] LIU D，NIKOO M，BORAN G，et al. Collagen and gelatin[J]. Annual review of food science and technology，2015，6：527–557.

[2] SIONKOWSKA A，ADAMIAK K，MUSIA K，et al. Collagen based materials in cosmetic applications：a review[J]. Materials，2020，13(19)：4217.

[3] AVILA RODRGUEZ M I，RODRGUEZ BARROSO L G，SNCHEZ M L. Collagen：a review on its sources and potential cosmetic applications[J]. Journal of cosmetic dermatology，2018，17(1)：20–26.

[4] OLSEN D，YANG C，BODO M，et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery[J]. Advanced drug delivery reviews，2003，55(12)：1547–1567.

[5] LIN K，ZHANG D，MACEDO M H，et al. Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine[J]. Advanced functional materials，2019，29(3)：1804943.

[6] HUETTNER N，DARGAVILLE T R，FORGET A. Discovering cell-adhesion peptides in tissue engineering：beyond RGD[J]. Trends in biotechnology，2018，36(4)：372–383.

[7] QIU Y，ZHAI C，CHEN L，et al. Current insights on the diverse structures and functions in bacterial collagen-like proteins[J]. ACS Biomaterials science & engineering，2021，9(7)：3778–3795.

[8] XU Y，KEENE D R，BUJNICKI J M，et al. Streptococcal Scl1 and Scl2 proteins form collagen-like triple helices[J]. Journal of biological chemistry，2002，277(30)：27312–27318.

[9] MOHS A，SILVA T，YOSHIDA T，et al. Mechanism of stabilization of a bacterial collagen triple helix in the absence of hydroxyproline[J]. Journal of biological chemistry，2007，282(41)：29757–29765.

[10] YU Z X，AN B，RAMSHAW J A，et al. Bacterial collagen-like proteins that form triple-helical structures[J]. Journal of structural biology，2014，186(3)：451–461.

[11] KESIK-BRODACKA M. Progress in biopharmaceutical development[J]. Biotechnology and applied biochemistry，2017，3(65)：306–322.

[12] ANDRZEJ F. Three decades of research on recombinant collagens：reinventing the wheel or developing new biomedical products?[J]. Bioengineering，2020，7(4)：155.

[13] PENG Y Y，YOSHIZUMI A，DANON S J，et al. *Streptococcus pyogenes* derived collagen-like protein as a non-cytotoxic and non-immunogenic cross-linkable biomaterial[J]. Biomaterials，2010，31(10)：2755–2761.

[14] PENG Y Y，STOICHEVSKA V，SCHACHT K，et al. Engineering multiple biological functional motifs into a blank collagen-like protein template from *Streptococcus pyogene*[J]. Journal of biomedical materials research part A，2014，102(7)：2189–2196.

[15] PICKER J，LAN Z，ARORA S，et al. Prokaryotic collagen-like proteins as novel biomaterials[J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology，2022，10：840939.

[16] GOLSER A V，SCHEIBEL T. Routes towards novel collagen-like biomaterials[J]. Fibers，2018，6(2)：21.

[17] QIAN Z G，PAN F，XIA X X. Synthetic biology for protein-based materials[J]. Current opinion in biotechnol-ogy，2020，65：197–204.

[18] 齐静静，范炳森，张萌，等. 信号肽及发酵条件优化促进胶原蛋白在谷氨酸棒杆菌中分泌表达[J]. 食品与发酵工业，2022，48(15)：9–17.

[19] 胡金远，乔士达，张萌，等. 富脯氨酸胶原蛋白的重组表达及热稳定性研究[J]. 食品与发酵工业，2022，48(5)：15–22.

[20] PENG Y Y，HOWELL L，STOICHEVSKA V，et al. Towards scalable production of a collagen-like protein from *Streptococcus pyogenes* for biomedical applications[J]. Microbial cell factories，2012，11(1)：146.

[21] 毛洪丽，刘雨，张建国. 荧光蛋白及其在微生物过程工程中的应用[J]. 食品与发酵业，2019，45(17)：252–257.

[22] CABANTOUS S，WALDO G S. In vivo and in vitro

（下转第 27 页）

62–66.

［11］王昶，刘芳，胡文红，等. 改性蛭石无机矿物絮凝剂的性能研究[J]. 天津科技大学学报，2018，33(2)：49–53.

［12］王昶，林鹏，张稹. 以蛭石矿物为原料的无机絮凝剂的制备方法及其应用：201410553661.7[P]. 2014–10–16.

［13］环境保护部标准司. 制革及毛皮加工工业水污染物排放标准：GB 30486—2013[S]. 北京：中国环境科学出版社，2013.

［14］李劲，董连平，高建川，等. 不同离子类型 PAM 对煤气化细渣絮凝沉降效果分析[J]. 矿业研究与开发，2023，43(8)：180–185.

［15］张勇，刘祎阳，付志婷，等. 不同絮凝剂对废弃钻孔泥浆的絮凝效果试验研究[J]. 浙江工业大学学报，2023，51(4)：412–417.

责任编辑：周建军

（上接第 19 页）

protein solubility assays using split GFP[J]. Nature methods，2006，3(10)：845–854.

［23］CABANTOUS S，P?DELACQ J D，MARK B L，et al. Recent advances in GFP folding reporter and Split-GFP solubility reporter technologies. Application to improving the folding and solubility of recalcitrant proteins from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of structural and functional genomics，2005，6：113–119.

［24］LENZ P，HILGERS F，BURMEISTER A，et al. The iSplit GFP assay detects intracellular recombinant proteins in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial cell factories，2021，20(1)：1–14.

［25］CABANTOUS S，TERWILLIGER T C，WALDO G S. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein[J]. Nature biotechnology，2004，23(1)：102–107.

［26］JAVIER S A，MARK D，GEOFFREY S W，et al. In-depth high-throughput screening of protein engineering libraries by Split-GFP direct crude cell extract data dormalization[J]. Chemistry & biology，2015，22(10)：1406–1414.

［27］JACKREL M E，CORTAJARENA A L，LIU T Y，et al. Screening libraries to identify proteins with desired binding activities using a Split-GFP reassembly assay[J]. ACS Chemical biology，2010，5(6)：553–562.

［28］ZHANG S F，MA C，MARTIN C. Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins[J]. Cell，2004，119(1)：137–144.

［29］JEEVITHAN E，BAO B，BU Y，et al. Type Ⅱ collagen and gelatin from silvertip shark（*Carcharhinus albimarginatus*）cartilage：isolation，purification，physicochemical and antioxidant properties[J]. Marine drugs，2014，12：3852–3873.

［30］苏俊豪，贺友铎，崔佳，等. 内蒙古地区鲤鱼鳞片胶原的提取及其结构性能的研究[J]. 食品与发酵工业，2024，50(13)：247–255.

［31］MERRETT K，WAN F，LEE C J，et al. Enhanced collagen-like protein for facile biomaterial fabrication[J]. ACS Biomaterials science and engineering，2021，7：1414–1427.

［32］OLIVEIRA V M，ASSIS C R D，COSTA B A M，et al. Physical，biochemical，densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources：a review based on the sustainable valorization of aquatic by-products[J]. Journal of molecular structure，2021，1224：129023.

［33］SHOULDERS M D，RAINES R T. Collagen structure and stability[J]. Annual review of biochemistry，2009，78(1)：929–958.

［34］高贵贤. 胶原蛋白的酶法交联及成膜特性研究[D]. 天津：天津科技大学，2020.

［35］高玲玲，侯成立，高远，等. 胶原蛋白热稳定性研究进展[J]. 中国食品学报，2018，18(5)：195–207.

［36］李金凤. Split-GFP 系统检测肽片段插入蛋白的研究[D]. 合肥：安徽农业大学，2020.

［37］GUERREIRO M R，FERNANDES A R，COROADINHA A S. Evaluation of structurally distorted Split-GFP fluorescent sensors for cell-based detection of viral proteolytic activity[J]. Sensors，2020，21(1)：24.

责任编辑：郎婧