

· 生物技术与方法 ·

视黄素蛋白的表达优化及其与蜡乳液在纳米涂层中的应用

刘宇晴, 夏媛媛, 沈微, 杨海泉, 陈献忠*

江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

刘宇晴, 夏媛媛, 沈微, 杨海泉, 陈献忠. 视黄素蛋白的表达优化及其与蜡乳液在纳米涂层中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4258-4274.

LIU Yuqing, XIA Yuanyuan, SHEN Wei, YANG Haiquan, CHEN Xianzhong. Optimization of retinin expression and the application with wax emulsion in nanocoatings[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4258-4274.

摘要: 仿果蝇眼睛的抗反射纳米涂层是一种具有巨大市场潜力的生物可降解材料, 可用于制造各种需要抗反射性能的光学设备。相较于物理化学法, 采用微生物表达视黄素蛋白为在温和条件下制备纳米涂层提供了新思路。然而, 目前抗反射涂层的关键——视黄素蛋白的表达水平较低, 难以满足大规模生产。本研究通过分析筛选果蝇来源视黄素蛋白的最佳表达宿主, 优化视黄素蛋白的表达水平, 确定了中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary, CHO)是视黄素蛋白的高效表达宿主, 获得纯化的视黄素蛋白。同时, 探索羊毛脂纳米乳液的制备方法, 确定了特定浓度视黄素蛋白及与蜡乳液的比例为16:4, 纳米涂层形成体系 pH 为 7.0, 温度为 30 °C 时, 纳米涂层的抗反射能力最佳。本研究为人工绿色可降解抗反射涂层的未来应用奠定基础, 提供了蛋白表达优化思路, 并通过纳米涂层的成分确定及体系成分浓度、pH 及温度的优化, 增强了人工抗反射纳米涂层的抗反射能力并降低了生产成本。

关键词: 视黄素蛋白; 表达优化; 纳米涂层; 抗反射

Optimization of retinin expression and the application with wax emulsion in nanocoatings

LIU Yuqing, XIA Yuanyuan, SHEN Wei, YANG Haiquan, CHEN Xianzhong*

School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Anti-reflective nanocoatings that mimic the eyes of fruit flies are biodegradable

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100102-03); 国家自然科学基金(32001064)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100102-03) and the National Natural Science Foundation of China (32001064).

*Corresponding author. E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-02-19; Accepted: 2023-05-23

materials with great market potential for a variety of optical devices that require anti-reflective properties. Microbial expression of retinin provides a new idea for the preparation of nanocoatings under mild conditions compared to physicochemical methods. However, the current expression level of retinin, the key to anti-reflective coating, is low and difficult to meet mass production. In this study, we analyzed and screened the best expression hosts for *Drosophila*-derived retinin protein, and optimized its expression. Chinese hamster ovary (CHO) cells were identified as the efficient expression host of retinin, and purified retinin protein was obtained. At the same time, the preparation method of lanolin nanoemulsion was explored, and the best anti-reflective ability of the nano-coating was determined when the ratio of specific concentration of retinin protein and wax emulsion was 16:4, the pH of the nano-coating formation system was 7.0, and the temperature was 30 °C. The enhanced antireflective ability and reduced production cost of artificial antireflective nanocoatings by determining the composition of nanocoatings and optimizing the concentration, pH and temperature of system components may facilitate future application of artificial green degradable antireflective coatings.

Keywords: retinin; expression optimization; nanocoatings; anti-reflective

近年来,纳米技术已成为改善涂层性能的新策略。纳米涂层除了拥有传统涂层系统的防护性能之外,在纳米尺度下还展现出高硬度、紫外线散射以及均匀分散等特性。同时,纳米涂层的卓越多功能性,使其成为下一代涂层系统的更优候选^[1]。目前,纳米涂层的抗反射作用备受关注。自然界中存在着丰富的抗反射结构,其中蛾眼、蝇眼、蝉翼和蝴蝶翼等纳米涂层结构被广泛应用于抗反射涂层中^[2]。昆虫角膜表面的纳米结构在空气和晶状体材料的折射率之间形成梯度,进而具备抗反射能力^[3]。蛾眼的表面纳米结构在宽角度和一定频率范围内在减小表面反射方面发挥着重要作用^[4]。最近研究表明,果蝇角膜结构揭示了纳米涂层形态和功能之间的确切联系,并证实在图灵模式下,视黄素蛋白和蜡这两个组分分别充当激活剂和抑制剂,在形成纳米涂层时具有优异的抗反射性能。此外,这项研究还成功地利用这两种组分,通过自组装能力构建出具有抗反射性能的人工纳米涂层^[5]。

目前抗反射涂层广泛使用 SiO₂、MgF₂、TiO₂、Si₃N₄和 ZrO₂等材料。常用的方法有溶胶-凝

胶+旋涂或+浸涂、溅射、直流或射频磁控管以及电纺^[6]。先进的纳米制造方法有电子束光刻、纳米压印光刻、全息光刻、快速原子束蚀刻、胶体光刻和反应离子蚀刻等^[2]。通常制备纳米涂层的方法包括苛刻的物理构造(如光刻、蚀刻等)或使用有毒化学试剂,这些涂层方案仅适用于高电阻表面材料。然而,大多数生物医学类纳米涂层需要处理敏感的软物质材料和温和的操作条件。此外,许多传统的涂层技术相对复杂,需要高技术的昂贵设备,这些限制严重阻碍了适用于各种表面类型的具有生物相容性纳米涂层的发展。基于自组装方法构建视黄素蛋白和蜡乳液的纳米涂层具有制作方法温和、涂层绿色环保等特点,为当前工业微纳米结构构建提供了一种生态友好的替代方法^[5]。为了纳米涂层的进一步应用,其关键成分视黄素蛋白的高效表达与蜡乳液的制备成为纳米涂层制备的关键性问题。

透明角膜具有高度有序的结构,可透射光并作为外部和眼内环境之间的屏障^[7]。其中积累了高比例的分类单元特异性多功能蛋白质^[8],研究发现视黄素蛋白是果蝇角膜特异性分泌蛋白^[9],

并且新研究进一步表明视黄素蛋白是果蝇角膜表面纳米涂层的关键成分^[4]，因此增加其异源表达水平也成为人工纳米涂层构建的挑战。目前仅有瑞士日内瓦大学的 Vladimir 团队在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中成功实现了视黄素蛋白的异源表达^[5]，然而缺乏详细数据和进一步探索。基于此，本研究旨在探究高效表达视黄素蛋白的方法。

蜡是最具疏水性的脂质之一，其长链脂肪醇和烷烃的极性较低，因此已被广泛应用于提高多种产品的疏水性^[10-11]。羊毛脂含有 98% 的酯，由脂肪酸和脂肪醇的混合物组成。羊毛脂与人体皮肤的化学结构相似，具有出色的抗菌和保湿特性，在缓解干眼症和预防眼睛感染方面发挥着重要作用^[12]。基于羊毛脂的性质以及其应用广泛，选择使用羊毛脂制备蜡乳液，并与视黄素蛋白相互作用以形成纳米涂层。

相较于微乳液膜，纳米乳液膜在一定的蜡掺入水平下表现出更高的拉伸强度。并且纳米乳液液滴具有较小的体积和更大的表面积，从而增加其与基质的相互作用，并降低膜内聚性的干扰。同时，由于纳米乳液尺寸减小，使疏水相更好地分散，含纳米乳液的涂层相对含微乳液的涂层的表面更平滑，

聚集更少，膜网络结构更加有序，使纳米涂层有更好的机械和防水性能^[13]。因此制备纳米级别蜡乳液成为实现高性能纳米涂层关键所在。

本研究通过筛选分析果蝇来源的视黄素蛋白最佳表达宿主，优化了视黄素蛋白的表达水平，为视黄素蛋白的表达和纯化建立一定的基础。同时，成功建立了一种有效制备羊毛脂纳米蜡乳液的方法，为纳米涂层的表征奠定了基础；此外，进一步通过改变视黄素蛋白与蜡乳液的浓度比、作用体系 pH 和温度对形成的人工纳米涂层的抗反射能力进行了探究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和引物

本研究中的重组蛋白表达菌株为毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta gami2 (DE3)、昆虫细胞 SF9、哺乳动物细胞中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary, CHO)，克隆宿主为大肠杆菌 JM109 和大肠杆菌 DH10BAC (昆虫阳性克隆筛选)。研究中使用及构建的表达菌株如表 1 所示，基因克隆和质粒构建所用引物如表 2 所示。

表 1 基因表达菌株

Table 1 Strains used for gene expression

Strain	Genotype and related characteristics
GS115 G1	GS115::RNori
GS115 G2	GS115::RNori (without α -factor secretion signal)
Rosetta gami2 R0	Rosetta gami2 with pET28a
Rosetta gami2 R1	Rosetta gami2 with pET28a-RNopt
Rosetta gami2 R2	Rosetta gami2 with pET28a-eGFP
Rosetta gami2 R3	Rosetta gami2 with pET28a-RNopt-eGFP
Rosetta gami2 R4	Rosetta gami2 with pET28a-SKIK-RNopt-eGFP
Rosetta gami2 R5	Rosetta gami2 with pET28a-SKIK-RNopt-P2A-eGFP
SF9 S1	SF9 with Bacmid-RNori
CHO C1	CHO with pCDNA3.4-RNori-FC
CHO C2	CHO with pCDNA3.4-RNori-his6-thrombin-FC

medium, BMGY): 胰蛋白胨 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 磷酸氢二钾 3 g/L, 磷酸二氢钾 11.8 g/L, YNB 13.4 g/L, 生物素 4×10^{-4} g/L, 甘油 10%;

Buffered methanol-complex medium (BMMY) 培养基: 胰蛋白胨 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 磷酸氢二钾 3 g/L, 磷酸二氢钾 11.8 g/L, Yeast nitrogen base (YNB) 13.4 g/L, 生物素 4×10^{-4} g/L, 甲醇 1%。

卡那霉素、庆大霉素、四环素、X-GAL 和 IPTG 购自北京鼎国生物技术有限责任公司; DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶均购自 TaKaRa 公司; 凝血酶购自北京博奥拓达科技有限公司; 昆虫细胞培养基和高效转染试剂购自北京义翘神州科技股份有限公司; 胎牛血清 FBS 购自天杭生物科技股份有限公司; OptiPRO SFM 培养基、ExpiFectamineTM CHO 转染试剂盒购自赛默飞世尔科技中国有限公司; 羊毛脂等其他常规试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器和设备

酶标仪购自伯腾仪器有限公司; 蛋白电泳仪购自伯乐 Bio-Rad 公司; 超声波清洗仪购自南京禾创科学器材有限公司; 超声波细胞破碎仪购自骋克仪器(上海)有限公司; 基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱仪购自布鲁克·道尔顿公司; 纳米粒度及 ZETA 电位分析仪购自英国马尔文仪器有限公司; 原子力显微镜购自德国布鲁克科技有限公司; 紫外可见近红外分光光度计购自美国铂金埃尔默公司。

1.2 方法

1.2.1 毕赤酵母表达质粒的构建及蛋白的表达

视黄素蛋白编码基因的 cDNA (DGRC RH08687) 由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 并插入质粒 pUC57 中。以 pUC57-retinin 为模板设计引物进行 PCR, 获得目的基因 *RNori*, 正向引物包含 his 标签编码序列, 将标签添加到

视黄素蛋白的 N 末端。将 PCR 产物亚克隆到大肠杆菌毕赤酵母穿梭质粒 pPIC9k 的 *EcoR* I 和 *Not* I 位点, 获得含信号肽的 pPIC9k-RNori。以质粒 pPIC9k-RNori 为模板设计引物进行 PCR, 将 PCR 产物亚克隆到 pPIC9k 的 *Bam*H I 和 *EcoR* I 位点, 获得不含信号肽的 pPIC9k-RNori; 用 *Sal* I 限制性内切酶对质粒进行线性化, 将所得线性化质粒电转转化到毕赤酵母 GS115 基因组上, 电转效率约为 50 个转化子/ μ g 质粒 DNA, 测序验证正确后, 获得表达视黄素蛋白编码基因的毕赤酵母菌株。毕赤酵母 GS115 在 25 mL BMGY 培养基中生长 24 h 后, 收集菌体在 100 mL BMMY 培养基中通过每 24 h 添加 1% 甲醇 30 °C 进行诱导重组表达, 培养 5 d 后, 胞外分泌表达离心收集上清检测蛋白表达量, 胞内表达离心收集菌体, 酸洗玻璃珠破壁, 检测蛋白表达量。

1.2.2 大肠杆菌表达质粒的构建及蛋白的表达

视黄素蛋白编码基因的 cDNA 以大肠杆菌为宿主进行密码子优化后, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 并插入质粒 pUC57 中。以质粒 pUC57-retinin (opt) 为模板设计引物进行 PCR, 获得目的基因 *RNopt*, 反向引物包含 his 标签编码序列, 将标签添加到视黄素蛋白的 C 末端。将 PCR 产物亚克隆到 pET28a 的 *Xho* I 和 *Xba* I 位点, 将所得质粒转化到大肠杆菌 Rosetta gami2 菌株中, 转化效率约为 2×10^6 CFU/ μ g。测序验证正确后, 获得表达视黄素蛋白编码基因的大肠杆菌菌株。在 100 mL 2 \times YT 培养基中, 通过 1 mmol/L IPTG 诱导重组表达, 16 °C 诱导表达 20 h 后离心, 用 1 \times PBS 重悬细胞, 进行超声波破碎, 离心收集上清, 检测蛋白表达量。

1.2.3 大肠杆菌的表达蛋白优化

在载体 pET28a-RNopt 的 C 端融合 eGFP 蛋白获得指示视黄素蛋白表达量的融合蛋白 RNopt-

eGFP, 在此基础上设计引物使用全质粒 PCR 的方法, 在 pET28a-RNopt-eGFP 载体开放阅读框 N 端起始密码子后, 目的蛋白 N 端第一个氨基酸前, 插入 SKIK 短肽序列^[14], 构建 pET28a-SKIK-RNopt-eGFP 载体, 同样使用全质粒 PCR 构建含有 P2A 短肽^[15]的 pET28a-SKIK-RNopt-P2A-eGFP 载体, 转入大肠杆菌 Rosetta gami2 菌株中进行表达。使用多功能酶标仪进行绿色荧光强度的测量。

1.2.4 昆虫细胞表达质粒的构建及蛋白的表达

合成在 pUC57 载体上视黄素蛋白编码基因的 cDNA 通过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切将视黄素蛋白编码基因插入 pfastbacHA 质粒, 获得 pfastbacHA-RNori 质粒后, 转入 DH10BAC 感受态, 37 °C 避光培养 48 h; 蓝白斑筛选阳性克隆, 提取重组质粒, 重组穿梭质粒使用通用检测引物 M13-F 和 M13-R, PCR 鉴定病毒基因组是否转座成功。将鉴定正确的重组杆粒命名为 Bacmid-RNori。将 SF9 昆虫细胞调整到对数生长期, 细胞计数后按 2×10^6 个的密度将 SF9 细胞铺于细胞培养瓶中, 加入总体积为 1 mL 不含血清的 SIM SF 昆虫细胞培养基。加入转染试剂-DNA 复合物进行转染, 转染效率约为 85%。转染 2 h 后更换为含 10% 血清的 SIM SF 昆虫细胞培养基, 培养 3-5 d 后反复冻融收集上清为第 1 代病毒, 用 1 mL P1 代病毒感染 60 mL 昆虫细胞 SF9, 培养 2-3 d 之后, 离心收集上清, 得到 P2 代病毒; 用 1 mL P2 代病毒感染 60 mL 昆虫细胞 SF9, 培养 2-3 d, 得到 P3 代病毒。表达时用 4 mL P3 代病毒感染 60 mL, 培养 2-3 d 后收集细胞检测蛋白表达量。

1.2.5 哺乳动物细胞表达质粒的构建和蛋白的表达

在 pCDNA3.4 载体上 N 端信号肽后, FC 标

签前, 使用同源重组方法设计引物插入来自 pUC57 载体上视黄素蛋白编码基因的 cDNA, 获得 pCDNA3.4-RNori-FC 载体; 然后在目的蛋白和 FC 融合蛋白之间插入 his 标签和凝血酶酶切位点, 获得 pCDNA3.4-RNori-his6-thrombin-FC 载体, 在 CHO 细胞密度为 6×10^6 cells/mL 进行转染, 转染效率约为 80%。25 mL 转染体系中, 质粒最终浓度为 0.8 μ g/mL, 1 mL OptiPRO SFM 稀释质粒, 0.92 mL OptiPRO SFM 稀释转染试剂, 80 μ L ExpiFectamine CHO Reagent, 将混合物进行混合静止 3 min 左右, 将混合物加入到培养瓶中的细胞液中, 将摇瓶放置于 37 °C、8% CO₂ 的培养箱中的摇床上进行培养。18-22 h 后进行补料, 加入 150 μ L ExiCHO Ehancer 和 6 mL ExpiCHO Feed 之后进行培养。培养 5 d 后收集上清检测蛋白表达量。

1.2.6 视黄素蛋白的纯化及鉴定

(1) 视黄素蛋白的纯化

选择装有 1 mL 的 Ni-NTA μ Sphere 填料的重力柱进行毕赤酵母、大肠杆菌、昆虫细胞表达视黄素蛋白的纯化, 使用 250 mmol/L 咪唑的洗脱液收集目的蛋白; 选择装有 1 mL 的 Protein A 填料的重力柱进行哺乳动物细胞表达视黄素蛋白的纯化, 使用 1 mol/L 甘氨酸洗脱液收集目的蛋白; 使用超滤离心管除去其中的高浓度咪唑, 得到的蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析检测。

(2) Bradford 法测定蛋白浓度

以牛血清蛋白作为标准蛋白测定蛋白浓度标准曲线。具体操作参照试剂盒说明书。

(3) 基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)分析

回收 SDS-PAGE 凝胶蛋白质条带于 1.5 mL EP 管中, 然后对凝胶进行脱色、溶化、消化等预处理, 用 MALDI-TOF MS 仪器分析, 鉴定蛋白质。

1.2.7 羊毛脂纳米乳液的制作

将 4 g 羊毛脂添加到含有 40 mL 10% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)水溶液的试管中, 并在 80 °C 的温度下在水浴中超声处理 2 h。随后在室温下培养 24 h 后, 将富含蜡纳米滴的上部用 1×PBS 稀释 10 倍, 并在室温下进一步培养 48 h。所得混合物的上部富含大于 500 nm 的蜡滴, 丢弃。将下部溶解在 1×PBS 中, 使蜡乳液 $OD_{600}=0.5$, 最后使用超声破碎仪, 获得羊毛脂蜡纳米乳液。

1.2.8 纳米乳液的性质测量

使用纳米粒度及 zeta 电位分析仪对每个羊毛脂蜡乳液样品的粒径、聚合物分散性指数(polymer disparity index, PDI)、zeta 电位进行分析, 并通过 10 次测量获取数据, 每次测量 5 次, 每次测量之间间隔 1 s。用相同的设备测量羊毛脂蜡乳液的 zeta 电位, 共测量 10 次, 每次测量 5 s, 间隔 1 s。所有样品均进行 3 份重复分析。

1.2.9 体外纳米涂层的制作和表征

在玻璃载玻片中心滴加 $OD_{600}=0.5$ 的蜡纳米乳液后, 滴加视黄素蛋白(0.6 mg/mL), 在室温 50%–60% 的湿度下逐渐干燥 20 min, 使用超纯水轻缓地对载玻片表面进行清洗, 然后再干燥, 重复 2 次。使用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)观察纳米涂层的表面形貌, 采用半接触法对覆盖在玻璃薄片上的人工纳米涂层进行了测量, 扫描尺寸为 1 μm 。使用紫外可见近红外分光光度计对纳米涂层进行抗反射能力的测定, 测量位置用孔径(200 $\mu\text{m}\times 200 \mu\text{m}$)确定, 测量波长为 400–750 nm 条件下纳米涂层的透射率(T%), 测量间隔为 2 nm, 所有样品均进行 3 份重复分析。

2 结果与分析

2.1 视黄素蛋白编码基因在毕赤酵母中的表达

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种甲醇营养型酵母, 因其调控严谨、表达强度高、易于高密度发酵和能进行蛋白后修饰等优点, 许多异源蛋白选择毕赤酵母作为表达宿主^[16]。本研究选用毕赤酵母作为宿主表达果蝇来源的视黄素蛋白。首先, 毕赤酵母中视黄素蛋白编码基因被分泌表达。如图 1A 所示浓缩后目标条带大小附近未观察到蛋白表达。为进一步分析视黄素蛋白在胞外无法表达的原因, 去除蛋白表达信号肽, 选择毕赤酵母胞内表达视黄素蛋白, 破壁纯化蛋白后, 分析 SDS-PAGE 图谱, 如图 1B 所示, 表达出不符合理论蛋白大小(17.8 kDa)的蛋白。随后, 使用 MALDI-TOF MS 进行进一步蛋白质鉴定(图 1C), 结果显示纯化得到的蛋白不是目的蛋白, 可能是由于毕赤酵母中存在影响蛋白质纯化结果的内源性组氨酸序列。胞内胞外均没有观察到视黄素蛋白的表达, 从而排除因重组蛋白的过量产生使内质网折叠和分泌能力过载导致目的蛋白不能正常分泌的原因。结果表明毕赤酵母 GS115 不是视黄素蛋白表达的合适宿主, 推测视黄素蛋白编码基因在毕赤酵母中表达水平较低或者蛋白质降解也可能是导致视黄素蛋白不能成功表达的原因^[17]。

2.2 视黄素蛋白编码基因在大肠杆菌中的表达

由于大肠杆菌培养操作简单、转化和转导效率高、生长繁殖快、成本低廉, 可以快速大量合成目的蛋白^[18], 视黄素蛋白编码基因经密码子优化后通过 IPTG 诱导表达, 如图 2 所示, SDS-PAGE 结果显示有目的蛋白条带, 与理论分子量(17.8 kDa)一致, 这表明视黄素蛋白可以在大肠杆菌中成功表达。然而, 其表达水平较低, 需要进一步优化。

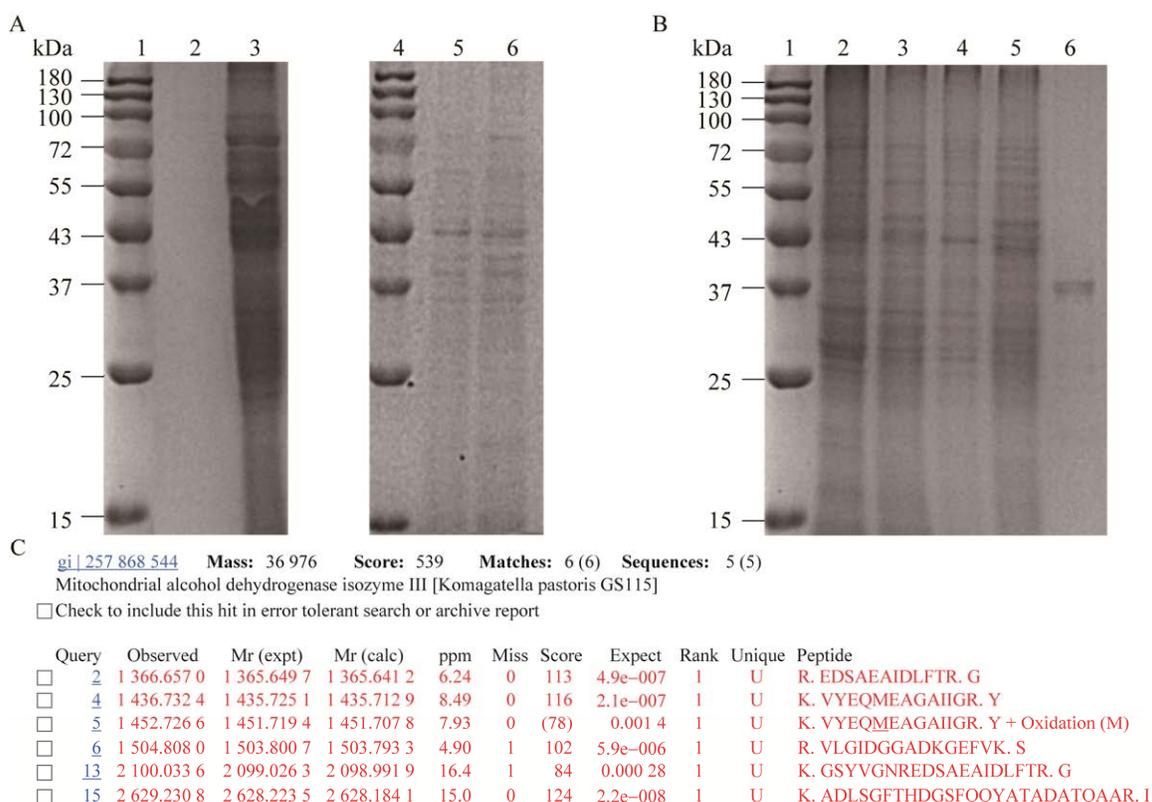


图1 视黄素蛋白编码基因在毕赤酵母中的表达

Figure 1 The expression of the gene encoding retinin protein in *Pichia pastoris*. A: Secretory expression of retinin in GS115. 1: Marker; 2: Control; 3: Supernatant after concentrating; 4: Marker; 5: Flow-through solution; 6: 250 mmol/L imidazole eluate. B: Intracellular expression of retinin in GS115. 1: Marker; 2: Whole cells; 3: Supernatant; 4: Precipitate; 5: Flow-through solution; 6: 250 mmol/L imidazole eluate. C: MALDI-TOF MS analysis.

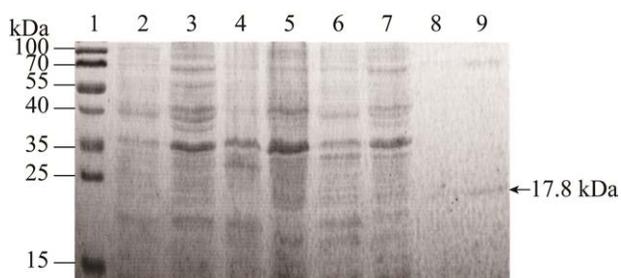


图2 视黄素蛋白编码基因在大肠杆菌中的表达

Figure 2 The expression of the gene encoding retinin protein in *Escherichia coli*. 1: Marker; 2: Whole-cell (blank); 3: Whole-cell (retinin); 4: Supernatant (blank); 5: Supernatant (retinin); 6: Precipitation (blank); 7: Precipitation (retinin); 8: Elution solution (retinin); 9: 250 mmol/L imidazole eluate (retinin).

有研究报道, 在蛋白质的 N 端插入 Ser-Lys-Ile-Lys (SKIK)短肽标签可以显著提高目的蛋白质表达水平。例如, 在大肠杆菌系统中添加 SKIK 标签, 小鼠单克隆抗体产量增加了 30 倍^[4]。本研究利用增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, eGFP) 编码基因作为报告基因, 探究了 SKIK 短肽对视黄素蛋白表达的影响, 并进一步评估了 C 端融合 P2A 短肽对提高目的蛋白表达水平的作用。利用视黄素蛋白与 eGFP 分别构建了 3 种不同融合方式的重组质粒 pET28a-RNopt-eGFP、pET28a-SKIK-RNopt-eGFP、pET28a-SKIK-RNopt-P2A-eGFP (图 3A), 其中

SKIK-RNopt-P2A-eGFP 融合蛋白的理论分子量为 48.5 kDa,通过 SDS-PAGE 进行全细胞表达分析,发现在理论分子量附近有明显条带(图 3B)。相较于 RNopt-eGFP (理论分子量为 45.9 kDa)和 SKIK-RNopt-eGFP (理论分子量为 46.4 kDa),其表达水平显著提升。经荧光检测进一步发现,SKIK 短肽和融合蛋白 P2A 短肽均能在一定程度上提高蛋白表达水平。其中,SKIK-RNopt-P2A-eGFP 融合蛋白的荧光强度最高(图 3C)。此外,在对 SKIK-RNopt-P2A-eGFP 融合蛋白进行

进一步表达时,观察到纯化的融合蛋白样品在加热处理后可能存在部分聚集现象,导致 SDS-PAGE 结果呈现偏大(图 3D)。

综上,SKIK 短肽和 P2A 短肽的引入可以进一步提高融合蛋白的表达水平,改造后的荧光强度是初始的视黄素蛋白与绿色荧光蛋白的融合蛋白的荧光强度的 4.8 倍。然而,在纯化过程中出现了融合蛋白断裂以及目的蛋白回收困难等问题,因此考虑更换宿主来进一步提高目的蛋白的表达水平。

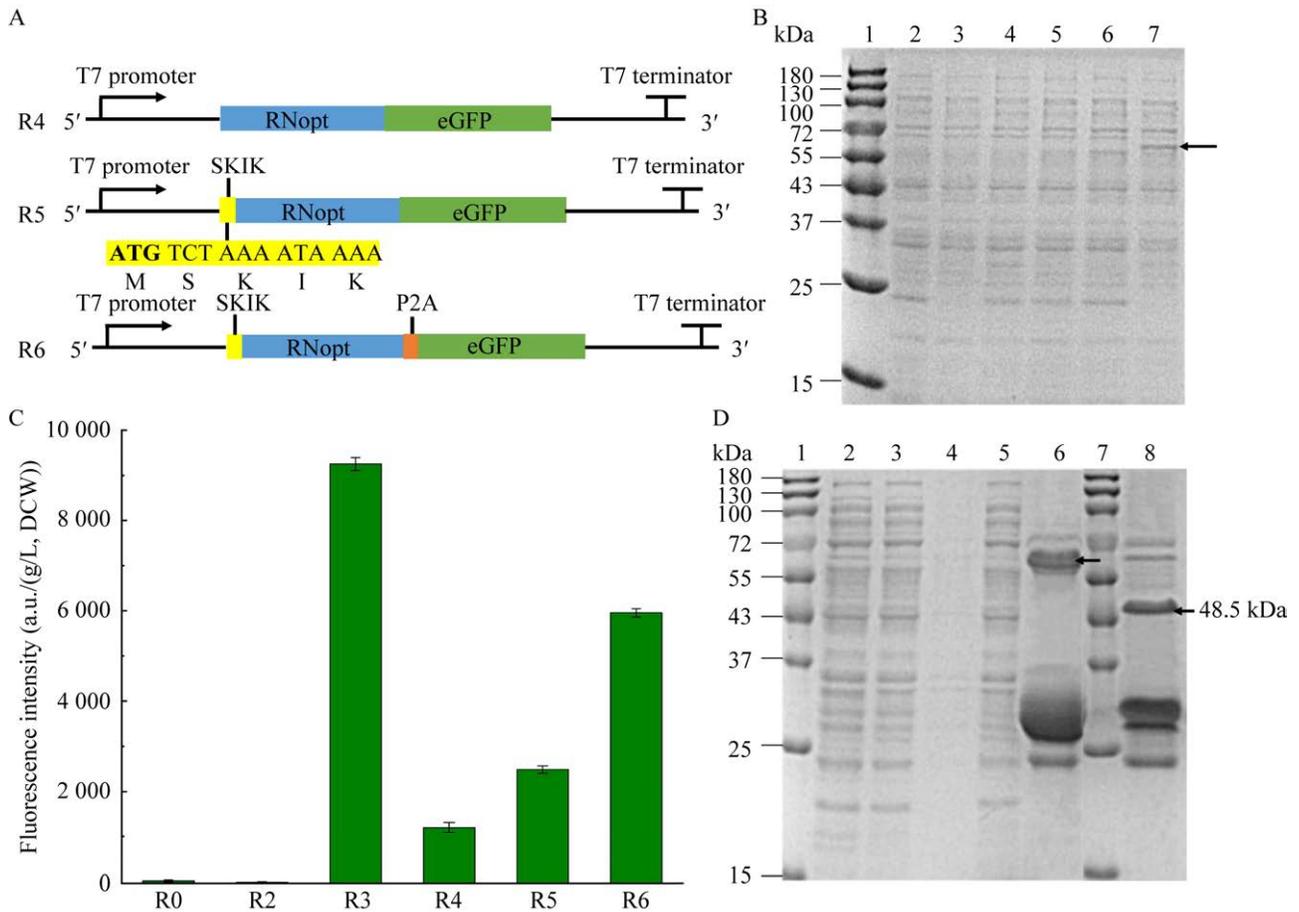


图 3 视黄素蛋白编码基因在大肠杆菌中的表达优化

Figure 3 The expression optimization of the gene encoding retinin protein in *Escherichia coli*. A: Schematic of protein expression optimization vectors. B: SDS-PAGE test for protein expression optimization vectors. 1: Marker; 2: R0 (pET28a); 3: R2 (pET28a-RNopt); 4: R3 (pET28a-eGFP); 5: R4 (pET28a-RNopt-eGFP); 6: R5 (pET28a-SKIK-RNopt-eGFP); 7: R6 (pET28a-SKIK-RNopt-P2A-eGFP). C: Comparison of different samples on fluorescence intensity from B. D: SDS-PAGE test for R5 protein expression. 1: Marker; 2: Whole-cell; 3: Supernatant; 4: Precipitation; 5: Flow-through solution; 6: 250 mmol/L imidazole eluate; 7: Marker; 8: Elution solution samples were not cooked.

2.3 视黄素蛋白编码基因在昆虫细胞中的表达

广泛应用于昆虫细胞中重组蛋白生产的 SF9 杆状病毒表达载体系统^[19], 具有所得到的重组病毒易于筛选, 并具备高效表达外源基因以及翻译后修饰功能等特点。如图 4 所示, 相较于大肠杆菌, 昆虫细胞中视黄素蛋白的表达水平进一步提高, 并可以通过镍柱纯化获得较纯的目的蛋白。但是也有部分目的蛋白以包涵体的形式存在于沉淀中。根据最终蛋白纯化结果测定, 培养 60 mL 可获取 3 mg 纯化的视黄素蛋白。总体而言, 昆虫细胞表达系统能够成功表达单独的视黄素蛋白。然而, 考虑到包涵体问题以及昆虫表达系统需要进行病毒反复侵染和长时间培养等因素, 对于实现视黄素蛋白的大规模表达应用仍存在一定挑战。

2.4 视黄素蛋白编码基因在哺乳动物细胞中的表达

CHO 细胞具有良好的基因组背景特征, 并且在悬浮培养中具有相对较快的生长速度和较

高的蛋白质表达产量, 因此它被用作生物制品行业的主要生产用细胞系^[20]。FC 融合蛋白策略是一种常用的大量表达可溶性蛋白表达方法。FC 融合蛋白保持了功能性蛋白的活性, 同时可提高目的蛋白在哺乳动物中的表达分泌, 并提高分子稳定性。构建含有信号肽和 FC 标签的哺乳动物细胞表达载体(图 5A)。视黄素蛋白与 FC 标签融合蛋白的理论分子量为 45.6 kDa, 如图 5B 所示, 实际分子量偏大, 可能存在哺乳细胞中目的蛋白和 FC 融合蛋白糖基化的问题。根据最终纯化结果及浓度测定, 25 mL 培养液最终可获得 5 mg 纯化的融合蛋白。视黄素蛋白编码基因在哺乳动物细胞中表达量显著提高, 但由于 FC 标签较大, 可能会对后续功能性纳米涂层的形成产生影响。为了获得单一的视黄素蛋白, 在视黄素蛋白和 FC 标签之间插入凝血酶切割位点, 并通过添加凝血酶将视黄素蛋白与标签切割分离。随后, 利用镍柱纯化技术获得 3.75 mg 纯化的视黄素蛋白, 回收效率为 75%(图 5C), 质谱分析结果进一步确定纯化的蛋白为视黄素蛋白(图 5D)。综上所述, 视黄素蛋白编码基因成功在 CHO 细胞中大量表达, 为其在纳米涂层领域的广泛应用奠定了坚实基础。

2.5 纳米羊毛脂蜡乳液的制备

蜡是纳米涂层的关键成分之一, 制备纳米级别的蜡乳液是纳米涂层制备的关键性问题。使用 SDS 溶解羊毛脂, 在 80 °C 下使用超声清洗仪超声孵育 2 h 后, 测量得到乳液粒径为 251.2 nm。超声破碎仪对其进行后续的纳米乳化, 并优化了超声破碎条件。结果显示, 超声破碎功率 20%, 超声 1 h 时, 所得到的乳液粒度最小(图 6A)。此时羊毛脂蜡乳液的粒径为 156.1 nm, PDI 值为 0.156, zeta 电位为 -62.2 mV (图 6B), 表明处理后的乳液已转变为纳米乳液, 且乳液粒度分布均匀、体系稳定。因此确定羊毛脂纳米蜡乳液的制备条件为超声破碎功率 20% 时超声 1 h。

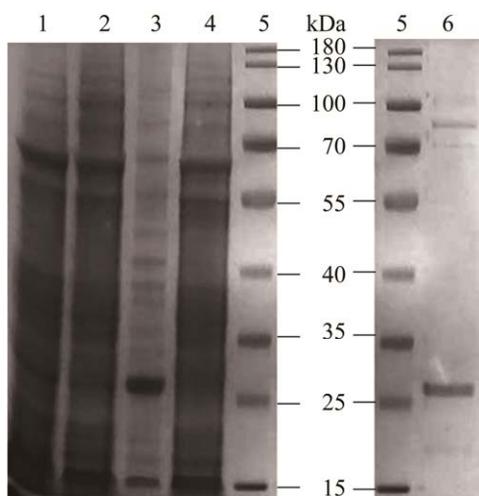


图 4 视黄素蛋白编码基因在昆虫细胞中的表达
Figure 4 Expression of the gene encoding retinoid protein in insect cells. 1: Whole-cell; 2: Supernatant; 3: Precipitation; 4: Flow-through solution; 5: Marker; 6: 250 mmol/L imidazole eluate.

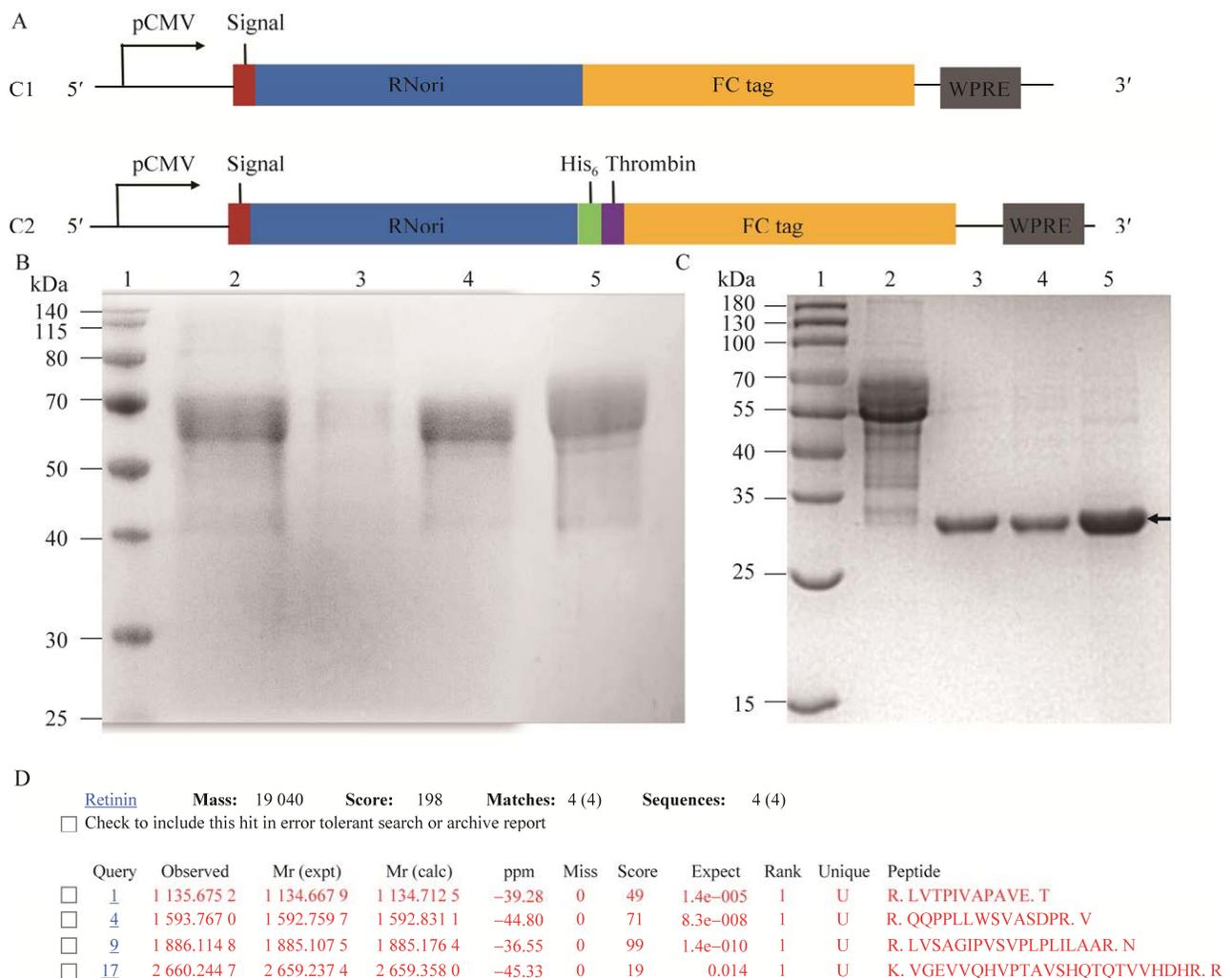


图5 视黄素蛋白编码基因在哺乳动物细胞的表达

Figure 5 The expression of the gene encoding retinin protein in mammalian cells. A: Schematic view of the mammalian expression vector. B: SDS-PAGE test for protein expression in CHO. 1: Marker; 2: Whole-cell; 3: Flow-through solution; 4: 1 mol/L glycine eluate; 5: Protein purification concentrate solution. C: SDS-PAGE test of retinin after action by thrombin. 1: Marker; 2: Fusion protein of retinin and FC; 3: The protein after thrombin enzymatic digestion; 4: Flow-through solution; 5: 250 mmol/L imidazole eluate. D: MALDI-TOF MS analysis.

2.6 人工纳米涂层的表征

视黄素蛋白与蜡乳液之间相互作用形成果蝇角膜的抗反射纳米涂层^[5]。为探究其他蛋白质以及包含视黄素蛋白的融合蛋白对纳米涂层形成的影响,选择蜡乳液分别与牛血清蛋白、视黄素蛋白与FC标签的融合蛋白以及单一视黄素蛋白作用,观察形成纳米涂层的形貌以及抗反射能

力的表征。如图7A所示,当蜡乳液与视黄素蛋白作用(M3)时形成相对规则的乳头状结构,相对于蜡乳液与非视黄素蛋白(BSA)作用形成的涂层(M1)与视黄素蛋白FC标签融合蛋白形成的涂层(M2)结构更加突出,表明只有特异性蛋白视黄素蛋白能够在纳米蜡乳液包裹下正常作用聚集形成乳头状规则的纳米涂层。而当视黄素蛋白添

加融合蛋白后,因非特异性蛋白的存在影响视黄素蛋白与蜡乳液的作用,使视黄素蛋白不能正确折叠包裹形成乳头状的纳米涂层。进一步测量纳米涂层抗反射能力时(图 7B),结果显示,在具

有规则性乳头状结构的情况下,纳米涂层的抗反射能力更强。结果显示,其中乳头状结构最为规则的 M3,在 400–750 nm 波长范围内平均透射率最高为 93.50%。

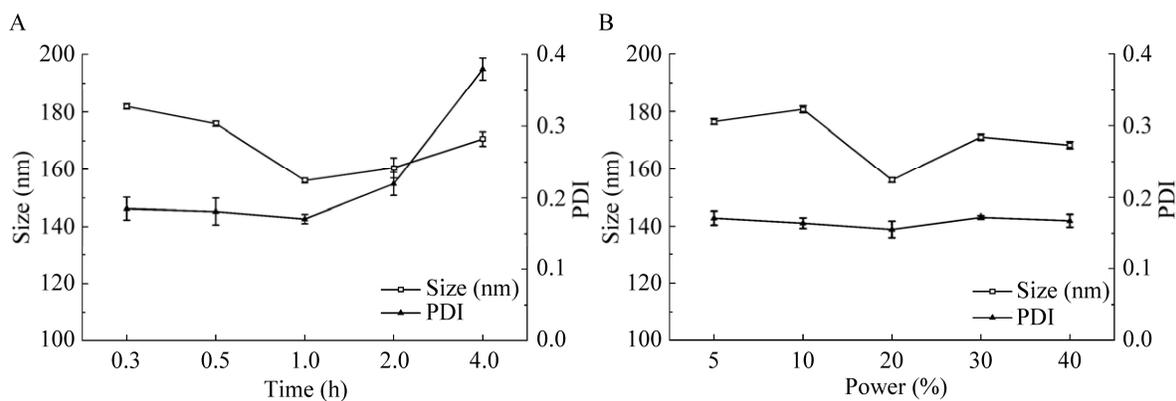


图 6 羊毛脂纳米蜡乳液的制备

Figure 6 Preparation of lanolin nanoemulsion. A: Comparison of different ultrasound time on nanoemulsion size and PDI. B: Comparison of different power on nanoemulsion size and PDI.

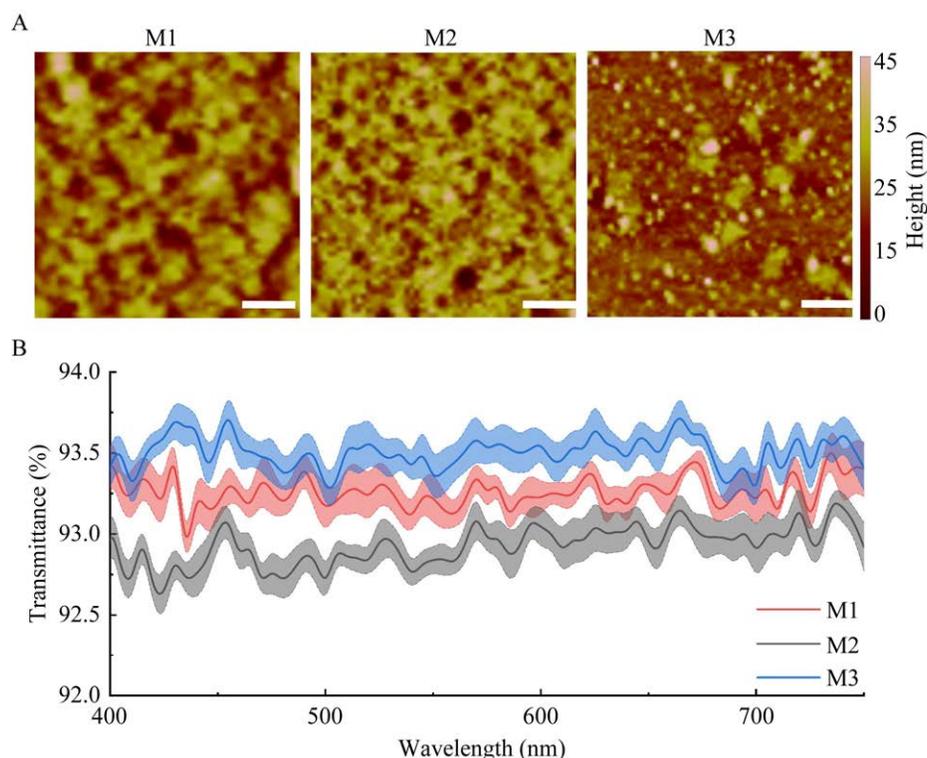


图 7 纳米涂层的表征

Figure 7 Characterization of the nanocoatings. A: AFM images of nanocoatings formed on glass for different admixtures of nanoemulsion and protein. M1: Nanoemulsion and BSA; M2: Nanoemulsion and fusion proteins of retinin and FC; M3: Nanoemulsion and retinin (16:4); Scale bars: 0.25 μm. B: Transmission spectra measured for samples from A.

结果表明单一视黄素蛋白在蛋白质与蜡乳液形成抗反射能力的纳米涂层具有特异性。在具有规则性乳头状结构的情况下,纳米涂层的抗反射能力更强。

2.7 蜡乳液和视黄素蛋白比例对纳米涂层表征的影响

特异性蛋白(视黄素蛋白)与蜡乳液的作用是乳头状结构纳米涂层具有强抗反射能力的关键性因素,纳米涂层形成体系的关键成分浓度可能对纳米涂层更规则的形成有一定影响,本文将蜡乳液与视黄素蛋白以不同比例作用时,虽然都有乳头状规则的形状出现,但是当蜡乳液与视黄素蛋白为 16:4 的比例(M3)作用,相较于其他浓度比例(M4, M5)排列更为规则,表面形貌更为明显(图 8A)。如图 8B 所示,进一步验

证涂层的抗反射能力,当纳米蜡乳液与视黄素蛋白以 16:4 比例(M3)时,纳米涂层的抗反射能力最强。表明纳米蜡乳液与视黄素蛋白最佳浓度作用比例为 16:4,并且进一步验证纳米涂层乳头状排列越规则,涂层的抗反射能力越强。而 M4 和 M5 可能因为作用浓度关系,视黄素蛋白不能与蜡乳液恰当反应而全部发生结构的改变,进而形成的纳米涂层具有脊状结构与乳头状结构共存的情况,反而降低纳米涂层的抗反射能力^[5]。

结果表明视黄素蛋白与蜡乳液的体系浓度影响相互作用后的结构变化,进而对乳头状纳米涂层形成及纳米涂层抗反射能力的影响,抗反射涂层中纳米蜡乳液与视黄素蛋白最佳浓度作用比例为 16:4。

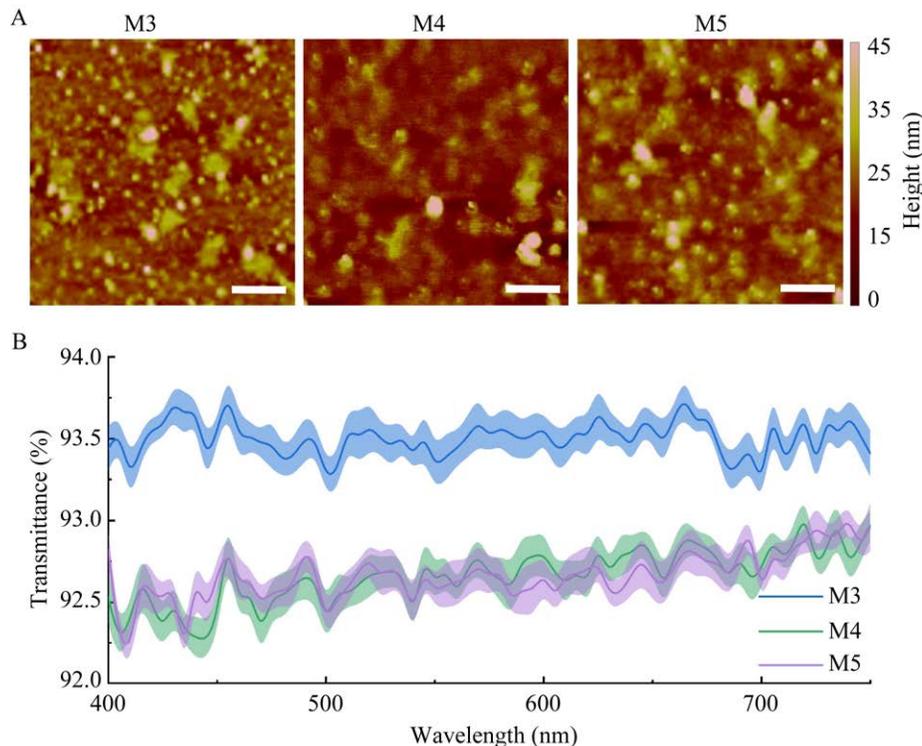


图 8 蜡乳液与视黄素蛋白比例对纳米涂层表征的影响

Figure 8 Effect of wax emulsion to retinin ratio on the characterization of nanocoatings. A: AFM images of nanocoatings formed on glass for different ratios admixtures of retinin and nanoemulsion. M3: Nanoemulsion and retinin (16:4); M4: Nanoemulsion and retinin (18:4); M5: Nanoemulsion and retinin (14:4); Scale bars: 0.25 μm . B: Transmission spectra measured for samples from A.

2.8 蜡乳液和视黄素蛋白作用体系 pH 对纳米涂层表征的影响

蛋白质分子的构象和界面处吸附的蛋白质层的净电荷都直接受到 pH 变化的影响。当环境 pH 接近蛋白质的等电点时, 蛋白质的净电荷最小, 被蛋白质乳化的脂肪球之间的排斥力减小, 导致稳定性变差^[21]。因此本文将 pH 作为纳米涂层表征的优化条件之一, 由于视黄素蛋白的等电点为 5.21, 选择 pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0 的作用环境对纳米涂层表征的影响进行进一步探究。如图 9A 所示 pH 对涂层的形成影响较大, 当 pH 为 5.0 (M6) 和 6.0 (M7) 时, 视黄素蛋白不能有效分散与聚集, 纳米涂层不能形成结构明显的纳米涂层, 抗反射能力相比于正常聚集的 M3 有所降

低(图 9B), 因此证明在纳米涂层结构的形成中体系 pH 的重要作用, 同时也确定 pH 7.0 为视黄素蛋白与蜡乳液形成抗反射纳米涂层的最佳 pH。

2.9 蜡乳液和视黄素蛋白作用体系温度对纳米涂层表征的影响

目前已经有许多工作来研究温度对溶液中两种溶质之间疏水相互作用的影响, 发现随着温度的升高, 可能会增加疏水相互作用的强度^[22]。同时蛋白质与纳米颗粒表面的附着亲和力也强烈依赖于孵育温度^[23]。因此选择蜡乳液与视黄素蛋白作用体系温度对纳米涂层表征进行进一步验证, 探究生物纳米涂层形成的最佳温度。本文选择 20 °C (M8)、25 °C (M3) 和 30 °C (M9) 作为实验探究温度, 如图 10A、10B 所示 30 °C 条件下形

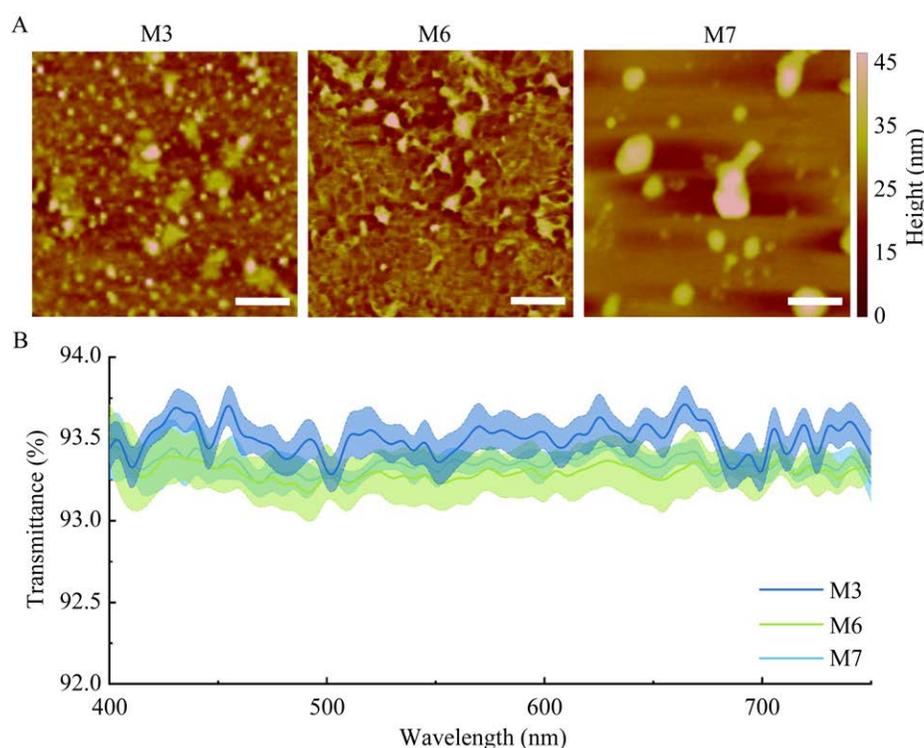


图 9 蜡乳液与视黄素蛋白作用体系 pH 对纳米涂层表征的影响

Figure 9 Effect of pH of the wax emulsion and retinin interaction system on the characterization of nanocoatings. A: AFM images of nanocoatings formed on glass from a mixture of retinin and nanoemulsion with different pH. M3: pH 7.0; M6: pH 5.0; M7: pH 6.0; Scale bar, 0.25 μm . B: Transmission spectra of samples measured from A.

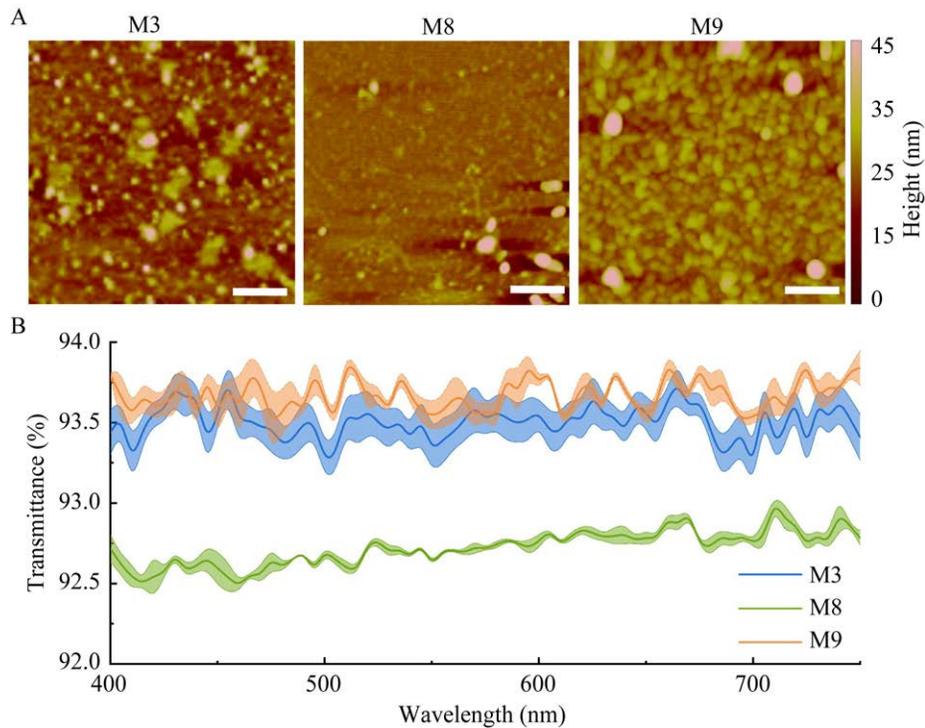


图 10 蜡乳液与视黄素蛋白作用体系温度对纳米涂层表征的影响

Figure 10 Effect of temperature of the wax emulsion and retinin interaction system on the characterization of nanocoatings. A: AFM images of nanocoatings formed on glass from retinin and nanoemulsion mixtures at different ambient temperatures (M3: 25 °C; M8: 20 °C; M9: 30 °C; Scale bar: 0.25 μ m). B: Transmission spectra of samples measured from A.

成的纳米涂层有相对其他温度更佳的面形态和抗反射能力,在 400–750 nm 波长范围内平均透射率为 93.67%,相对于此前透射率最高的 M3 涂层提高了 0.17%。相对于此前透射率最低的 M4 涂层提高了 1.00%。虽然在 20 °C 也形成纳米涂层乳头状结构,但是可能由于温度低,蛋白间的聚集减小,形成与其他温度比较下更小尺寸的结构,不能有效增加抗反射能力。因此证明在纳米涂层结构的形成中,体系温度具有重要作用,同时也确定 30 °C 为视黄素蛋白与蜡乳液形成抗反射纳米涂层的最佳温度。

3 讨论与结论

目前,细菌、酵母^[16,24]、昆虫细胞^[25]和哺乳

动物细胞系^[19]已经被广泛用于目标蛋白的表达。本文分别选择毕赤酵母 GS115 菌株、大肠杆菌 Rosetta gami2 菌株、昆虫细胞 SF9 菌株和哺乳动物 CHO 细胞表达视黄素蛋白编码基因,进而确定 CHO 细胞是视黄素蛋白的高效表达宿主,并成功获得纯化的视黄素蛋白。

在视黄素蛋白和蜡乳液纳米涂层的制备中,纳米蜡乳液的制备为涂层表征的优化奠定了基础。超声破碎功率为 20%,超声 1 h 时,蜡乳液的粒度最小,形成纳米蜡乳液。在此基础上,对视黄素蛋白与羊毛脂纳米蜡乳液的纳米涂层的形成进行了进一步探究,表明视黄素蛋白的结构影响了乳头状纳米涂层的形成及纳米涂层的抗反射能力。当纳米蜡乳液与视黄素蛋白以 16:4

的比例作用时,反应体系为 pH 7.0,温度为 30 °C 时,纳米涂层的乳头状排列更规则,表面形貌更明显,抗反射能力更强。

推测具有强结构规则的纳米涂层需要满足两个必要条件。首先,合适的反应条件使视黄素蛋白结构发生变化,增加视黄素蛋白的二级结构,成为具备聚集成球状结构的前提。其次,蛋白质与蜡乳液的分子间作用力需要均匀分布,视黄素蛋白聚集的球状结构被蜡乳液均匀包裹,形成均匀分布的纳米乳头状结构。为检测纳米涂层的稳定性,用水冲洗抗反射涂层 27 h,电镜检测结果显示涂层的结构仍保持完整^[5]。本研究构建的涂层在湿度 50%的常温环境下放置半年后,结构无较大变化,表明该人工抗反射纳米涂层具有较强的稳定性。

综上所述,本研究建立了视黄素蛋白的高效表达策略,优化了生物相容性抗反射纳米涂层的制备方法,为绿色可降解抗反射涂层的工业化应用奠定了坚实基础。

REFERENCES

- [1] BAO WW, DENG ZF, ZHANG SD, JI ZT, ZHANG HC. Next-generation composite coating system: nanocoating[J]. *Frontiers in Materials*, 2019, 6: 72.
- [2] HAN ZW, MU ZZ, LI B, NIU SC, ZHANG JQ, REN LQ. A high-transmission, multiple antireflective surface inspired from bilayer 3D ultrafine hierarchical structures in butterfly wing scales[J]. *Small*, 2016, 12(6): 713-720.
- [3] GORBSN, GORB EV. *Functional Surfaces in Biology III Diversity of the Physical Phenomena*[M]. Switzerland: Springer, 2018, 29-53.
- [4] TADEPALLI S, SLOCIK JM, GUPTA MK, NAIK RR, SINGAMANANI S. Bio-optics and bio-inspired optical materials[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(20): 12705-12763.
- [5] KRYUCHKOV M, BILOUSOV O, LEHMANN J, FIEBIG M, KATANAIEV VL. Reverse and forward engineering of *Drosophila* corneal nanocoatings[J]. *Nature*, 2020, 585(7825): 383-389.
- [6] SARKIN AS, EKREN N, SAGLAM S. A review of anti-reflection and self-cleaning coatings on photovoltaic panels[J]. *Solar Energy*, 2020, 199: 63-73.
- [7] ZHAI JJ, WANG Q, TAO L. Connexin expression patterns in diseased human corneas[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2014, 7(4): 791-798.
- [8] PIATIGORSKY J. *Enigma* of the abundant water-soluble cytoplasmic proteins of the cornea: the refracton hypothesis[J]. *Cornea*, 2001, 20(8): 853-858.
- [9] KIM E, CHOI Y, LEE S, SEO Y, YOON J, BAEK K. Characterization of the *Drosophila melanogaster* retinaxin gene encoding a cornea-specific protein[J]. *Insect Molecular Biology*, 2008, 17(5): 537-543.
- [10] CAMPOS A, CLARO PC, LUCHESI BR, MIRANDA M, SOUZA FVD, DAVID FERREIRA M, MARCONCINI JM. Curaua cellulose sheets dip coated with micro and nano carnauba wax emulsions[J]. *Cellulose*, 2019, 26(13/14): 7983-7993.
- [11] RODRIGUES DC, ALBERTO CACERES C, RIBEIRO HL, de ABREU RFA, CUNHA AP, AZEREDO HMC. Influence of cassava starch and carnauba wax on physical properties of cashew tree gum-based films[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 38: 147-151.
- [12] UZUN M, OYMAK H. Polylactic acid and lanolin based nanofibrous structures for wound management application[J]. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 2022, 47: 105-115.
- [13] de OLIVEIRA FILHO JG, de OLIVEIRA NOBRE BEZERRA CC, ALBIERO BR, ALENCAR OLDONI FC, MIRANDA M, EGEE MB, de AZEREDO HMC, DAVID FERREIRA M. New approach in the development of edible films: the use of carnauba wax micro- or nanoemulsions in arrowroot starch-based films[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2020, 26: 100589.
- [14] OJIMA-KATO T, NAGAI S, NAKANO H. N-terminal SKIK peptide tag markedly improves expression of difficult-to-express proteins in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(5): 540-546.
- [15] EFIMOVA VS, ISAEVA LV, MAKEEVA DS, RUBTSOV MA, NOVIKOVA LA. Expression of cholesterol hydroxylase/lyase system proteins in yeast *S. cerevisiae* cells as a self-processing polyprotein[J]. *Molecular Biotechnology*, 2017, 59(9): 394-406.
- [16] YANG ZL, ZHANG ZS. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: a review[J]. *Biotechnology Advances*,

2018, 36(1): 182-195.

- [17] PUXBAUM V, MATTANOVICH D, GASSER B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 2925-2938.
- [18] ROSANO GL, CECCARELLI EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 172.
- [19] PAN CY, JIA WC, LU BS, BISHOP CE. Expression of TAT recombinant Oct4, Sox2, Lin28, and Nanog proteins from baculovirus-infected Sf9 insect cells[J]. Gene, 2015, 556(2): 245-248.
- [20] FISCHER S, HANDRICK R, OTTE K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(8): 1878-1896.
- [21] FACHIN L, VIOTTO WH. Effect of pH and heat treatment of cheese whey on solubility and emulsifying properties of whey protein concentrate produced by ultrafiltration[J]. International Dairy Journal, 2005, 15(4): 325-332.
- [22] SUN Q, FU YF, WANG WQ. Temperature effects on hydrophobic interactions: implications for protein unfolding[J]. Chemical Physics, 2022, 559: 111550.
- [23] MAHMOUDI M, SHOKRGOZAR MA, BEHZADI S. Slight temperature changes affect protein affinity and cellular uptake/toxicity of nanoparticles[J]. Nanoscale, 2013, 5(8): 3240-3244.
- [24] CEREGHINO JL, CREGG JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(1): 45-66.
- [25] LE LTM, NYENGAARD JR, GOLAS MM, SANDER B. Vectors for expression of signal peptide-dependent proteins in baculovirus/insect cell systems and their application to expression and purification of the high-affinity immunoglobulin gamma fc receptor I in complex with its gamma chain[J]. Molecular Biotechnology, 2018, 60(1): 31-40.

(本文责编 陈宏宇)