

蛋白质的非定点荧光标记 ——推荐一个化学生物学实验

洪歆怡, 薛太玲, 徐洲, 谢恩蓉, 吴明凯, 王青青, 吴丽娜*

厦门大学化学化工学院, 化学国家级实验教学示范中心(厦门大学), 福建 厦门 361005

摘要: 本论文介绍了一项化学生物学实验, 旨在利用异硫氰酸荧光素的异硫氰基与蛋白质氨基共价结合的原理, 实现对体外蛋白(以牛血清白蛋白为例)和体内蛋白(以大肠杆菌总蛋白为例)的非定点荧光标记。实验采用凝胶过滤法作为后续纯化手段, 并运用紫外-可见分光光度计、流式细胞术以及荧光显微镜对标记结果进行全面表征。该实验涵盖了多种基础和前沿实验技能, 与科研工作中常见的抗体荧光标记技术密切相关, 难度适中。通过参与这一实验, 学生不仅能够深入理解化学生物学基础知识, 提高综合实践能力, 还能够拓宽科研视野并培养科研思维。

关键词: 非定点荧光标记; 蛋白质; 异硫氰酸荧光素; 化学生物学实验

中图分类号: G64; O6

Non-Site-Specific Fluorescent Labeling of Proteins as a Chemical Biology Experiment

Xinyi Hong, Tailing Xue, Zhou Xu, Enrong Xie, Mingkai Wu, Qingqing Wang, Lina Wu *

National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (Xiamen University), College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China.

Abstract: This paper presents a chemical biology experiment designed to exploit the principle of covalent binding between fluorescein isothiocyanate and protein amines. This process is aimed at achieving non-site-specific fluorescent labeling of both extracellular proteins, exemplified by bovine serum albumin, and intracellular proteins, using *Escherichia coli* total protein as a case study. Gel filtration chromatography is employed as a subsequent purification method, with comprehensive characterization of the labeling results performed using UV-Visible spectrophotometry, flow cytometry, and fluorescence microscopy. This experiment encompasses a range of foundational and cutting-edge laboratory skills. It is closely aligned with the commonly employed antibody fluorescence labeling techniques in scientific research, presenting a moderate level of complexity. Participation in this experiment allows students to gain a profound understanding of fundamental concepts in chemical biology, enhance their comprehensive practical skills, broaden their research perspectives and nurture scientific thinking.

Key Words: Non-site-specific fluorescent labeling; Protein; Fluorescein isothiocyanate; Chemical biology experiment

化学生物学是一门由化学与生命科学互相交融的新兴交叉学科, 化学与生物、医药领域理论和技术的交叉融合实现了分子水平上对复杂生命过程的研究, 同时推动了化学学科在生命科学应用领

收稿: 2023-10-09; 录用: 2023-12-29; 网络发表: 2024-01-09

*通讯作者, Email: alina1222@xmu.edu.cn

基金资助: 2020年厦门大学教学改革研究项目

域的发展。作为面向化学生物学专业本科生的实验课程,“化学生物学综合实验”着重以培养学科交叉的实验技能和科研素养为目标导向,引导学生通过化学与生命科学交叉融合的实验项目,夯实相关实验技能并提升跨界实验能力和知识迁移能力。由于“化学生物学综合实验”面向高年级学生开课,所选实验项目要求为综合性实验,与科研接轨,且尽量在一个项目中涵盖多种实验操作技能,使学生通过短短一学期的学习掌握化学生物学核心实验操作。

蛋白质作为最重要的生物大分子之一,其复杂的结构、功能和相互作用在生命活动中至关重要。荧光标记法是一种常见的研究策略,用于准确定量蛋白质的表达和定位。这种方法具有操作简单、高准确性等优点,可根据标记物与目标蛋白结合的特异性程度分为定点标记和非定点标记两类。目前,定点标记是主流的蛋白质荧光标记技术,但使用有机荧光染料进行非定点蛋白标记也具有特殊的应用价值。

有机荧光染料可以直接标记细胞中的所有蛋白质。随后,可以通过酶标仪、荧光显微镜、流式细胞仪等仪器进行定量或定性的分析。此外,这些有机染料还可以与体外蛋白质(如抗体)结合,用于特异性检测抗原。因此,荧光标记的抗体在目标蛋白的可视化和定量标记方面具有广泛的应用。

本实验旨在介绍蛋白质标记的基本原理和多种标记策略,以拓宽学生的视野并激发其创新能力。我们采用异硫氰酸荧光素(*fluorescein isothiocyanate*, FITC)作为实验试剂,分别对牛血清白蛋白(BSA)和细菌的总蛋白进行标记,使学生掌握体外和体内非定点蛋白质荧光标记的理论和实验技术。此外,学生在实验结束后将有机会自主进行荧光标记抗体的实验,与使用商用荧光抗体相比,这不仅赋予他们更多的实验自主权,还有助于节约大量实验开支。在课堂上,学生将有机会亲身体流式细胞仪、荧光显微镜等前沿分析技术,这将促进实验方法的融会贯通,为他们今后的科学研究打下坚实的理论和实践基础。

1 实验目的

- (1) 掌握异硫氰酸荧光素标记蛋白的原理、操作方法和表征手段。
- (2) 巩固生物大分子纯化技术及原理,学习凝胶过滤的操作方法。
- (3) 了解荧光显微镜和流式细胞仪的工作原理,并初步掌握它们的使用方法。
- (4) 了解其他非定点标记蛋白质的原理和方法。

2 实验原理

2.1 非定点荧光标记

蛋白质标记技术可以根据标记物与氨基酸结合的特异性来区分定点标记和非定点标记。非定点标记主要指的是通过共价连接的原理对体系中的所有蛋白质无选择性的进行标记。其中,使用有机荧光染料是最常见的标记策略。其原理是利用目标蛋白上一些裸露的氨基、巯基、羧基或羟基与一些带有活性反应基团的荧光试剂反应。这些反应中,最常采用的衍生化位点通常是氨基。

2.2 异硫氰酸荧光素的标记与纯化

异硫氰酸荧光素(FITC)是一种极为经典的荧光标记染料,具备高量子产率和长荧光寿命等优势。FITC对亲核位点表现出高度的反应性,如赖氨酸上的氨基、半胱氨酸上的巯基以及酪氨酸侧链上的酚盐离子等(如图1a所示)。本实验利用FITC分子上的异硫氰基与蛋白质N端上伯胺基团高度选择性地反应,从而形成硫脲键,实现对体外蛋白(以BSA为例)和体内蛋白(以大肠杆菌总蛋白为例)的荧光标记。

对于BSA的FITC荧光标记,我们采用凝胶过滤法作为后续纯化的手段(如图1b)。该方法依据分子大小的不同,利用洗脱剂通过凝胶柱时产生的不同阻滞效应来实现纯化。而对于大肠杆菌总蛋白的FITC荧光标记,则采用多次磷酸盐缓冲液(*Phosphate-buffered saline*, PBS)洗涤和离心的方法,以去除游离的荧光染料。

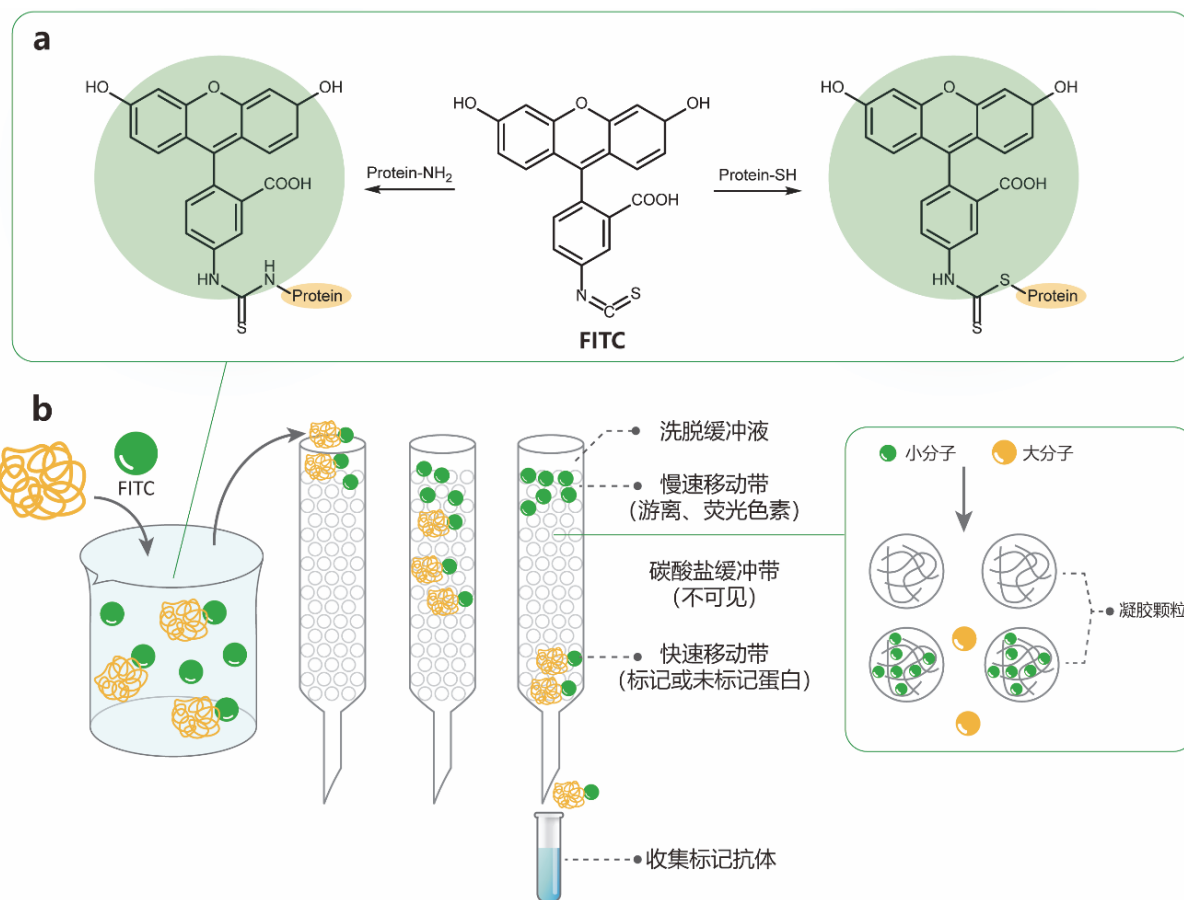


图1 异硫氰酸荧光素标记蛋白质(a)及纯化(b) (以BSA为例)原理图

2.3 标记效果的检测

BSA的FITC荧光标记效果通过紫外-可见分光光度计进行检测。这是因为FITC在280 nm和494 nm波长处具有吸收特性，其中， $CF = \varepsilon(280 \text{ nm})/\varepsilon(494 \text{ nm}) = 0.3$ ；而蛋白质只在280 nm波长处吸收光，对494 nm的光几乎不吸收；根据BSA在280 nm处的摩尔吸光系数和FITC在494 nm处的摩尔吸光系数，

$$\text{蛋白浓度}(M) = \frac{A_{280} - (A_{494} \times CF) \times \text{稀释倍数}}{\varepsilon_{280}}$$

根据以上公式可对标记在BSA上的FITC数量进行表征和计算。

大肠杆菌总蛋白的FITC荧光标记效果使用流式细胞仪和荧光显微镜进行检测和观察。

3 试剂与仪器

3.1 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) MG1655。

3.2 试剂

FITC购自Sigma (美国)，若经费有限可用国产品牌替代；BSA粉末($\geq 98\%$)、酵母提取物、胰蛋白酶、琼脂粉、4%多聚甲醛、Tris-HCl溶液($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.5)购自上海生工生物工程股份有限公司；硫酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠购自上海国药集团化学试剂有限公司；超纯水。

3.3 缓冲液和培养基(由3.2试剂配制)

实验中用到的培养基和溶液如表1所示。

表1 培养基和所用溶液

缓冲液或培养基	用途
FITC (5 mg·mL ⁻¹)	BSA标记
BSA溶液(1 mg·mL ⁻¹)	BSA标记
NaHCO ₃ Buffer (1 mol·L ⁻¹ , pH 9.0)	BSA标记
1 × PBS Buffer (pH 7.4)	BSA标记
Luria-Bertani (LB)固体培养基(灭菌)	细菌培养
LB液体培养基(灭菌)	细菌培养
Tris-EDTA (TE)缓冲液(pH 7.4, 灭菌)	菌液保存
FITC (60 μg·mL ⁻¹)	细菌总蛋白标记
10 × PBS Buffer (pH 9.0)	细菌总蛋白标记

3.4 耗材

离心管(1.5 mL, 50 mL)、培养皿、培养管、100 mL锥形瓶、PD-10脱盐柱、铁架台、移液枪和枪头、比色皿、盖玻片、载玻片。

3.5 仪器

实验中用到的仪器及相关参数如表2所示。

表2 实验仪器及其相关参数

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	AL104	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
恒温摇床	SKY-2102C	厦门精艺兴业科技有限公司
紫外-可见分光光度计	UV-1780	岛津仪器(苏州)有限公司
便携式紫外灯	ZF-5	上海沪西分析仪器厂有限公司
超高分辨率激光共聚焦显微镜	Leica SP8-STED 3X	德国徕卡仪器有限公司
流式细胞仪	BD FACS Verse™	Becton, Dickinson and Company (USA)
小型台式冷冻离心机	5424R	艾本德中国有限公司
高温高压灭菌锅	GR110DA	致微(厦门)仪器有限公司
超净工作台	SG403CE	The Baker Company (USA)
电热恒温培养箱	DHP-9162	上海一恒科技有限公司
酸度计	LE438	梅特勒-托利多仪器上海有限公司
SpectraMax iD5多功能酶标仪	iD5	美谷分子仪器(上海)有限公司
电热恒温水槽	DK-8D	上海一恒科技有限公司
紫外-可见-近红外分光光度计	Cary 5000	安捷伦科技(中国)有限公司

4 实验步骤

4.1 样品准备

4.1.1 BSA溶液的配制(课前准备)

在分析天平上准确称取10 mg的BSA粉末于1.5 mL离心管中, 加入10 mL 1 × PBS 缓冲液(pH 7.4), 配制成1 mg·mL⁻¹的溶液, 放置于4 °C冰箱待用。

4.1.2 *E. coli* MG1655菌液的制备(课前准备)

挑取*E. coli* MG1655单菌落于2 mL LB液体培养基中, 37 °C、250 r·min⁻¹过夜培养; 第二天将过夜培养菌液1 : 100稀释到15 mL LB培养基中, OD₆₀₀达到0.2左右时, 8000 r·min⁻¹离心5 min去除培养

基, 加入500 μL 4%多聚甲醛溶液固定30 min后, 用500 μL TE缓冲液洗涤两次, 最后重悬于500 μL TE缓冲液中, 放置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

4.1.3 FITC溶液的配制(现配现用, 防止异硫氰酸基团的解离降低偶联效率)

BSA标记用: 在分析天平上准确称取5 mg的FITC粉末于1.5 mL离心管中, 加入1 mL $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液(pH 7.4), 配制成5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 避光待用。

菌液标记用: 在分析天平上准确称取6 mg的FITC粉末于1.5 mL离心管中, 加入1 mL二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)溶液, 配制成6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 再用 $10 \times \text{PBS}$ 溶液(pH = 9.0)以1 : 100的比例稀释为60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 避光待用。

4.2 BSA和FITC吸收光谱和摩尔吸光系数的测定(选做)

分别移取1 mL的BSA溶液($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和FITC溶液($1.2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)至1 cm石英比色皿, 以缓冲溶液作为参比溶液, 测定波长范围为200–600 nm的吸收光谱, 确定最佳入射光波长; 在确定的入射光波长下(BSA为280 nm, FITC为494 nm), 配制BSA和FITC的系列标准溶液, 并分别测量其吸光值, 绘制标准曲线, 计算摩尔吸光系数。

4.3 BSA的非定点标记与纯化

4.3.1 标记

移取200 μL 的1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA溶液于1.5 mL的离心管中, 加入20 μL 的 NaHCO_3 缓冲液(1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 9.0), 充分混匀; 加入2 μL 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ FITC溶液, 充分混匀, 短暂离心使混合液都处于离心管底部; 用锡箔纸包裹离心管避光, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下摇床振荡孵育60 min。

4.3.2 纯化

将PD-10脱盐柱通过铁夹子固定在铁架台上; 用25 mL左右的 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液(pH 7.4)过柱平衡, 当 PBS 缓冲溶液液面与脱盐柱柱床上的砂芯平齐时, 旋紧软管螺旋夹; 将反应液贴壁移液铺展于脱盐柱顶, 并取少量 PBS 溶液洗涤离心管, 将洗液也转移至脱盐柱内; 旋开螺旋夹使柱内液体下流, 当液体与柱顶端砂芯相切时, 再次旋紧夹子, 并加入2 mL的 PBS 缓冲液, 调节螺旋夹使液体的流速保持在每滴30–45 s, 开始洗脱; 当 PBS 缓冲液液面再次降至砂芯处时, 追加 PBS 缓冲液, 并时常用紫外灯观察柱床上的条带, 前端的较窄的绿色荧光条带即为FITC-BSA, 用预先准备的洁净1.5 mL离心管收集该组分洗脱液; 产物条带收集毕, 完全松开软管的螺旋夹子, 用 PBS 洗涤柱子直至残余荧光染料组分完全洗脱离柱。

4.3.3 吸光度测定

移取600 μL 纯化的FITC-BSA至石英比色皿, 以 PBS 作为空白对照, 用紫外-可见分光光度计分别检测在280 nm和494 nm波长的吸光度。

4.4 大肠杆菌总蛋白的标记与检测^[1,2]

4.4.1 标记

取25 μL 菌液($6 \times 10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min弃上清; 用25 μL $10 \times \text{PBS}$ 缓冲液(pH 9.0)重悬, 并加入等体积60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FITC溶液, 混合均匀, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振摇孵育1.5 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min并用50 μL $10 \times \text{PBS}$ 缓冲液(pH 9.0)洗涤三次, 重悬于200 μL $10 \times \text{PBS}$ 缓冲液(pH 9.0)中。

4.4.2 流式细胞仪检测

将重悬好的菌液稀释100倍使浓度在 $10^6 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右, 在流式细胞仪上进行检测, 检测通道为FITC通道。

4.4.3 荧光显微镜检测

将重悬好的菌液浓缩10倍使菌液终浓度在 $10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右。吸取5 μL 样品于载玻片上, 轻轻盖上载玻片。使用共聚焦显微镜 $100 \times$ 油镜观察和拍摄明场和荧光场, 荧光场激发波长为488 nm, 无染色的菌液作为阴性对照以调节曝光条件。

5 结果与讨论

5.1 BSA和FITC光谱测定^[3]

使用紫外-可见分光光度计测量不同浓度BSA的吸收光谱(图2a), 利用Lamber-Beer定律计算BSA在280 nm处的摩尔吸光系数为 $36683 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 符合文献报道($43824 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。由于蛋白质的摩尔吸光系数与其色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和半胱氨酸(C)的含量相关, 因此280 nm下的BSA的摩尔吸光系数也可以通过以下公式计算^[4]:

$$\varepsilon = (nW \times 5500) + (nY \times 1490) + (nC \times 125)$$

同理, 根据FITC的吸收光谱得到FITC的最大激发波长为494 nm(图2b), 结合梯度稀释后得到的吸光度计算得到FITC的摩尔吸光系数为 $66923 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 符合文献报道($68000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)^[5]。

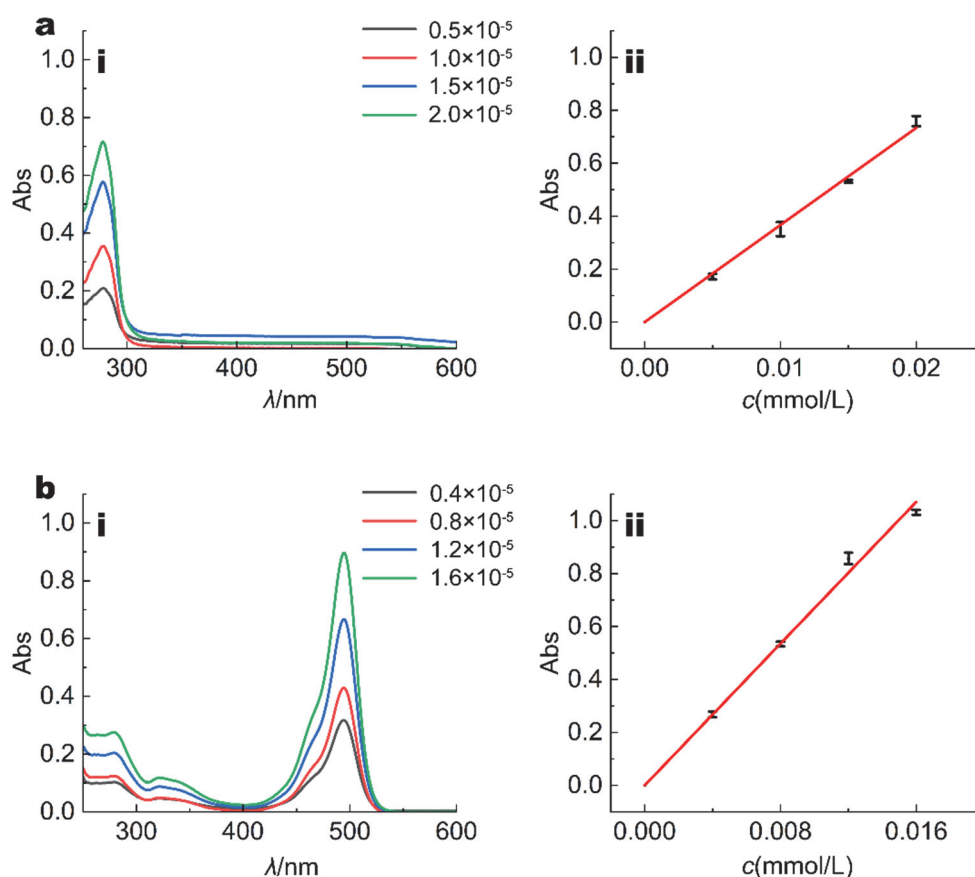


图2 (a) BSA的梯度稀释吸光光谱(i)及在280 nm的梯度稀释吸光度(ii);
(b) FITC的梯度稀释吸光光谱(i)及在494 nm的梯度稀释吸光度(ii)。

5.2 BSA的FITC标记效率计算

使用紫外-可见分光光度计测定FITC标记后的BSA样品在280 nm和494 nm的吸光值, 根据公式可以计算出标记后每个BSA蛋白上的FITC分子数。学生实验的FITC标记BSA的标记效率一般集中在2到3之间(表3)。

5.3 细菌的FITC标记结果

图3为FITC标记前后细菌的流式散点图(a)和荧光显微镜拍摄结果(b)。如图3a所示, 与未标记FITC的细菌相比, 标记了FITC的细菌荧光信号显著增强, 其中位值为7078, 而未标记FITC的细菌基本被背景信号所掩盖。从二者的显微镜荧光场图(图3b)看出, 标记了FITC的细菌具有强烈的荧光,

而未标记FITC的细菌无荧光信号,进一步说明FITC可以对细菌中的蛋白质进行荧光标记,可用于细菌的可视化。

表3 FITC标记后的BSA样品吸光值和标记效率

学生实验样品序号	A_{280}	A_{494}	标记效率
1	0.4171	0.6626	1.96
2	0.2304	0.3965	2.29
3	0.2425	0.4768	3.09
4	0.4373	0.7670	2.39
5	0.3445	0.6217	2.53

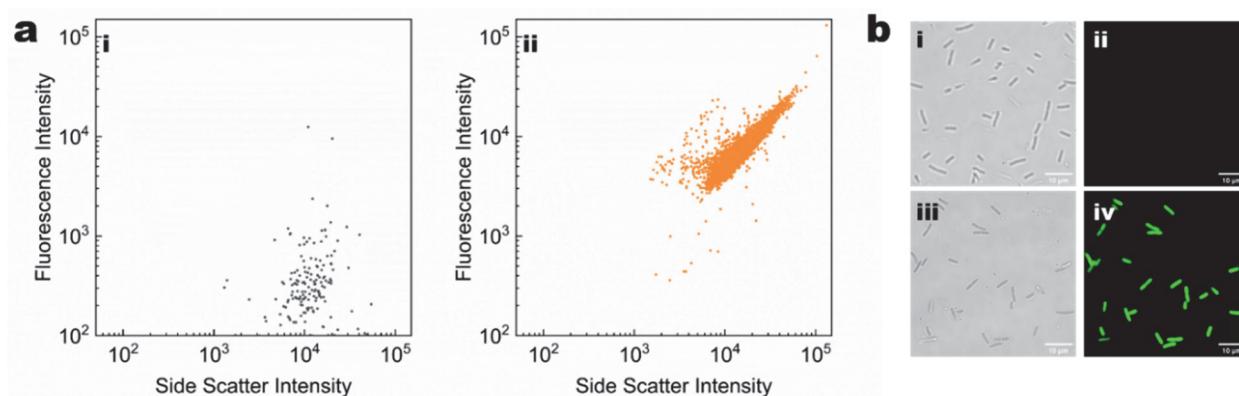


图3 (a) FITC标记*E. coli* MG1655前(i)后(ii)的流式细胞仪检测结果
(b) FITC标记*E. coli* MG1655的共聚焦显微镜拍摄情况: (i) 阴性对照明场、
(ii) 阴性对照荧光场、(iii) 实验组明场、(iv) 实验组荧光场, 比例尺为10 μm

5.4 荧光标记效果的影响因素

5.4.1 pH

我们首先考察标记体系pH对标记效果的影响。如图4a所示,在pH 6.0–9.0范围内,标记了FITC的大肠杆菌荧光强度随着标记体系pH的增加而增强;当体系pH超过10以后,细菌样本的荧光值出现了急剧增强且偏差显著变大的现象。

结合标记原理和FITC溶液在不同pH下的荧光强度,我们推测该实验结果可能为以下几方面原因所致:一是本标记反应实质为亲核试剂对异硫氰酸基团的中心亲电碳的进攻,碱性条件能使目标氨基处于非质子化状态,增强其亲核性有利于对中心亲电碳的进攻;二是FITC本身的荧光强度显著依赖于溶液pH,随着溶液pH的增强,溶液中 FH^- 和 F^{2-} 的浓度逐渐增大,因此在 $\text{pH} \approx 8-9$ 时具有最大的荧光量子产率(图4b)。两方面因素导致当标记体系的pH在6.0–9.0范围内,其标记效果随着pH增加而增强。但碱性太强时蛋白质三维结构遭到破坏,暴露出更多氨基,因此当标记体系pH大于9时,纵然FITC的荧光量子产率下降,但由于蛋白结构的破坏,更多暴露的氨基被标记上FITC而出现荧光强度增强的现象。另外,由于蛋白质结构的破坏的无序性使得暴露的氨基数量具有随机性,因此可能出现较大的标记结果偏差。

综合实验结果和推测,为了获得较好的标记效果且保持蛋白质的活性,我们认为 $\text{pH} = 9$ 为最佳标记条件。

5.4.2 缓冲液体系

由于FITC标记BSA时加入了10%的 NaHCO_3 溶液,为了尽可能地减少实验课程缓冲剂的种类,简化实验步骤,我们尝试用同等pH的10 \times PBS溶液进行替换。结果发现,无论是用 NaHCO_3 溶液还是相

同pH的PBS溶液, 对实验结果都没有显著影响(图5), 说明后续开展的实验可用pH 9.0的10 × PBS缓冲溶液替代NaHCO₃溶液。

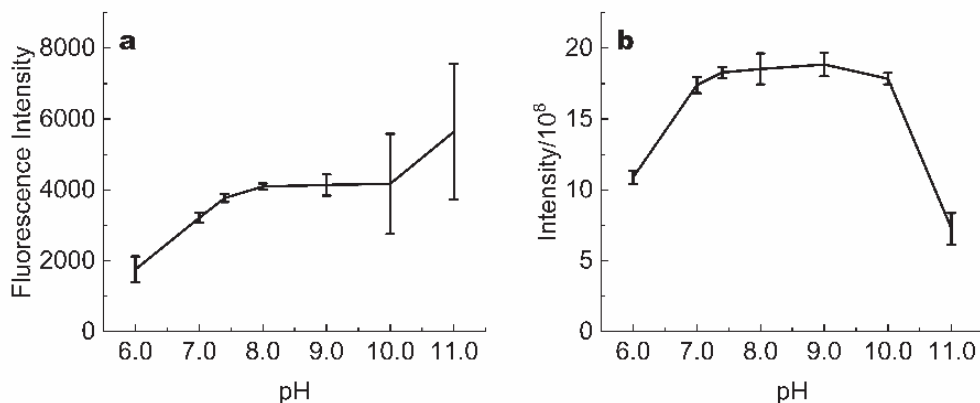


图4 (a) 不同pH标记条件下大肠杆菌的荧光信号; (b) FITC荧光强度随pH的变化

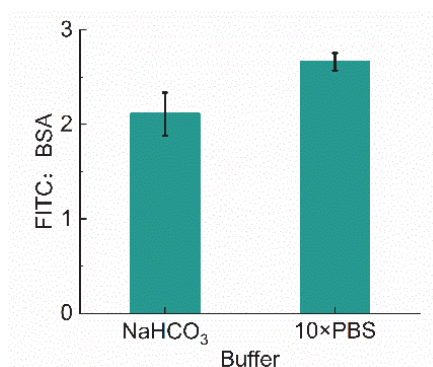


图5 用相同pH的NaHCO₃溶液和10 × PBS溶液标记BSA的标记效率对比

5.4.3 孵育温度

生物类实验的孵育温度通常根据样品的要求和实验条件设置在4 °C至37 °C之间。考虑到4 °C标记需要较长时间, 甚至需要过夜孵育, 因此我们考察了温度介于25 °C至37 °C之间的标记效果。如图6所示, BSA和大肠杆菌的标记效果随着温度升高而增加。考虑到教学实验的时间及蛋白质的活性, 我们建议在室温下(25 °C左右)孵育BSA进行荧光标记, 而在37 °C下孵育大肠杆菌进行荧光标记。

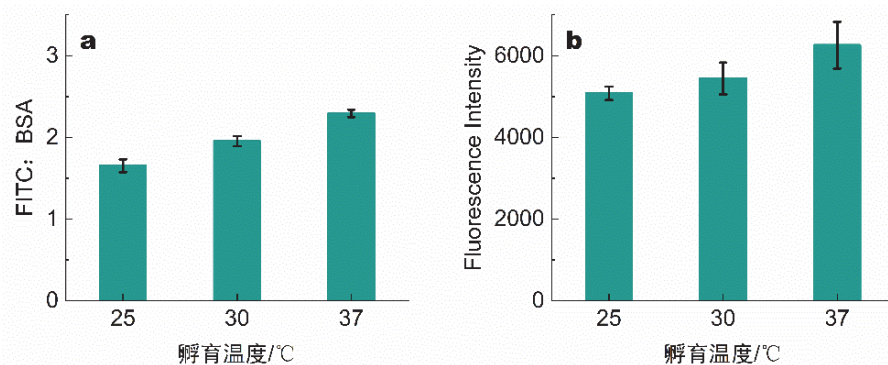


图6 孵育温度对BSA标记效率(a)和大肠杆菌荧光信号(b)的影响

5.4.4 大肠杆菌样品活性

由于细菌的固定操作相对复杂，我们探究了是否可以省略细菌固定的步骤。如图7a所示，标记了FITC的活细菌荧光散点图也能与背景信号明显分离，但其荧光中位值明显低于标记了FITC的固定细菌样本，二者的荧光强度中位值分别为734和9531。此外，FITC标记的活菌和固定菌的荧光分布直方图显示，它们之间的荧光信号接近基线分离。荧光显微镜的拍摄结果如图7b所示，标记了FITC的活细菌荧光强度明显低于固定细菌，且荧光主要集中在细菌边缘。这表明，FITC可以用于对活细菌进行标记，但FITC的穿透能力有限，主要集中在细菌的外膜蛋白上。因此，我们建议在本实验中仍然使用固定后的细菌样本。

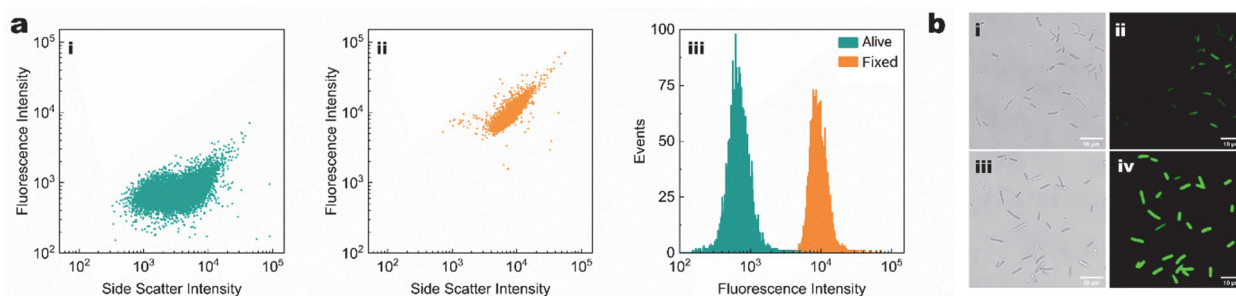


图7 大肠杆菌样品活性对荧光标记效果的影响(a) FITC标记的活细菌(i)、FITC标记的固定细菌(ii)散射信号和荧光信号二维散点图、FITC标记的固定细菌和活细菌荧光信号分布直方图(iii); (b) FITC标记的活细菌(i, ii)和固定细菌(iii, iv)共聚焦显微镜拍摄结果对比，比例尺为10 μm

6 教学组织运行方式

本综合实验要求学生具备一定的生物化学、分析化学、有机化学等基础知识，适合面向化学、生物、医学等专业方向大学二年级以上的学生开设。教学安排建议如下：

总计教学时数为6学时，其中1学时用于实验原理的讲解和演示操作，4.5学时用于实践部分，建议学生2人一组进行实验操作，剩余0.5学时用于教师点评和答疑。

(1) 课前预习与实验原理讲解：本实验在实验操作部分仅使用一种荧光染料，但在教材中介绍了多种非定点蛋白标记策略，学生需要课前阅读教材，以了解不同标记策略之间的差异。在课堂上，教师可以通过抽查学生对实验原理的简述来评估学生的预习情况，并根据需要调整原理部分的讲授时间。

(2) 演示操作与实验：由于孵育需要较长时间，大肠杆菌总蛋白标记和BSA标记可以交替进行。建议先进行大肠杆菌总蛋白的标记，在孵育的1.5小时内进行BSA的标记(1小时)和纯化(约0.5小时)；另外还可以引导学生思考影响标记效果的几种因素，如温度、pH、标记时间等。在实验过程中，可将学生分成不同的组，分配不同的实验条件，以综合考察全体学生的实验观察结果。如果学时有限，流式细胞仪和荧光显微镜的观察实验可以作为选修部分或观摩实验。

(3) 教师考评与答疑：评价方式可以结合过程评价和最终实验结果，鼓励学生将所学技术应用于科研训练和毕业设计中。

此外，本实验所使用的荧光染料也可以尝试替换为其它有机荧光染料，并可以与其它蛋白标记实验进行配套开展，如非天然氨基酸的定点嵌入和标记以及绿色荧光蛋白的克隆表达等。

7 结语

本实验已在厦门大学化学化工学院化学生物学专业的大四课程“化学生物学综合实验”中开展了多轮教学。在这门课程中，学生们普遍已经进入课题组进行科研训练，因此对于与生命科学相关

的实验技能掌握有着迫切的需求。本实验从官能团反应出发，介绍了多种类型的标记策略，以此拓宽学生的科研视野。在实验操作中，涉及了脱盐柱洗脱、显微镜制片等操作，以及高速离心机、荧光显微镜、流式细胞仪等生物类大型仪器的使用。这些让化学类专业的学生在短时间内快速掌握了生物类实验中常用的实验技能。实验结束后，学生能够立即将所学技能应用于毕业设计课题中，并巩固其知识技能。

参 考 文 献

- [1] Borth, N.; Mitterbauer, R.; Mattanovich, D.; Kramer, W.; Bayer, K.; Katinger, H. *Cytometry* **1998**, *31* (2), 125.
- [2] Stokke, C.; Flatten, I.; Skarstad, K. *PLoS One* **2012**, *7* (2), e30981.
- [3] Gill, S. C.; von Hippel, P. H. *Anal. Biochem.* **1989**, *182* (2), 319.
- [4] Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. *Protein Sci.* **1995**, *4* (11), 2411.
- [5] Tallapaka, S. B.; Karuturi, B. V.; Yeapuri, P.; Curran, S. M.; Sonawane, Y. A.; Phillips, J. A.; Smith, D. D.; Sanderson, S. D.; Vetro, J. A. *Int. J. Pharm.* **2019**, *565*, 242.