中国科学: 化学 2016 年 第 46 卷 第 9 期: 881 ~ 890
SCIENTIA SINICA Chimica chem.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

论 文

不同拓扑结构类弹性蛋白相变特性及机理研究

张丹丹, 蔡征文, 王金丹, 王心哲, 吴姝羽, 张光亚*

华侨大学化工学院生物工程与技术系, 厦门 361021
*通讯作者, E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-05; 接受日期: 2016-04-12; 网络版发表日期: 2016-08-29
国家自然科学基金(编号: 21376103)、华侨大学中青年教师科技创新资助计划(编号: ZQN-YX105)和华侨大学研究生科研创新能力培育计划资助项目

摘要 本文构建了不同拓扑结构的类弹性蛋白多肽(ELPs)融合蛋白, 考察了盐的类型及浓度对其相变特性的影响, 并与线性 ELPs 进行比较. 结果表明, 不同盐浓度类型下, 不同拓扑结构 ELPs 融合蛋白的相变温度平均比相同重复数的线性 ELPs 高 1~10.9℃. 其中, 三臂星型 ELPs 在 0.05 mol/L Na_2CO_3 溶液中与线性 ELP_{120} 相差最大, 达到 11.5℃; 同时, 随盐浓度的增加, 相变温度均呈线性递减. 然而, SpyCatcher-ELP_{40} 在低浓度(≤0.4 mol/L) Na_2CO_3 溶液中未发生相变, 在相同浓度的 NaCl 和 Na_2SO_4 溶液中则相变现象明显; 在高浓度(≥0.5 mol/L) Na_2CO_3 溶液中, 其相变温度骤降为 7.3℃, 与等浓度 Na_2SO_4 溶液中相变温度仅相差 0.15℃, 这一现象不符合 Hofmeister 离子序. 其可能的原因与 ELPs 所融合的 SpyCatcher 分子表面分布了大量带电荷的氨基酸有关, 并探讨了其作用机制.

关键词 类弹性蛋白多肽, SpyTag-SpyCatcher, Hofmeister 离子序, 相变温度, 蛋白拓扑结构

1 引言

过去 20 年中, 类弹性蛋白多肽(Elastin-like polypeptides, ELPs)作为智能响应性多肽家族中的一员而被广泛研究[1,2]. 它主要由五肽重复序列 Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (VPGXG)构成, 其中残基 Xaa 可以是除 Pro 之外的任何氨基酸[3]. 在加热时, ELPs 在很窄的温度范围内经历一个可逆相变过程; 若溶液温度低于 ELPs 的相变温度(transition temperature, Tt), ELPs 在溶液中高度可溶; 而当溶液温度高于 Tt 时, ELPs 发生聚集而不溶于溶液[4]. 这种特殊性能使其在重组蛋白(活性肽)的非色谱纯化、质粒 DNA 的提取和重金属离子吸附等方面表现出良好的应用前景[5~8]. 此外, 因其良好的生物相容性, ELPs 在组织修复[9]、伤口治愈[10]、血管移植[11]和细胞固定[12]以及药物靶向运输[13]等方面应用广泛. 根据应用范围及目的, 精确控制 ELPs 的相变温度是其中的关键问题. ELPs 的相变温度与自身序列长度和浓度[2,3]以及外界因素(如盐浓度和类型等)密切相关[14,15]. 其中, 盐对 ELPs 相变温度的影响最为显著, 这种影响符合 Hofmeister 离子序[16], 即 $CO_3^{2-}>SO_4^{2-}>S_2O_3^{2-}>H_2PO_4^->F^->Cl^->Br^->NO_3^->I^-$>$SCN^-$ (阴离子), NH_4^+>

引用格式: 张丹丹, 蔡征文, 王金丹, 王心哲, 吴姝羽, 张光亚. 不同拓扑结构类弹性蛋白相变特性及机理研究. 中国科学: 化学, 2016, 46: 881–890
Zhang DD, Cai ZW, Wang JD, Wang XJ, Wu SY, Zhang GY. The phase transition of elastin-like polypeptides with different topological structures. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 881–890, doi: 10.1360/N032016-00002

© 2016《中国科学》杂志社

Cs^+>Rb^+>K^+>Na^+>Li^+>Ca^{2+}>Mg^{2+} (阳离子). 但黄凯宗等[17]在考察 3 种阳离子(NH_4^+、K^+、Na^+)和 5 种阴离子对 ELP [KV_8F-20]相变温度的影响时发现, NH_4^+<K^+<Na^+等阳离子不符合 Hofmeister 离子序, 而阴离子则遵循.

近年来, 研究者发现, 短肽 SpyTag 中的 Asp^{117} 能和 SpyCatcher 中的 Lys^{31} 在生理条件下自发形成异肽键. SpyTag-SpyCatcher 来源于酿脓链球菌(*Streptcoccus pyogenes*)中自催化异肽键形成的亚基(CnaB2 域)的拆分[18,19]. 基于 SpyTag-SpyCatcher 基因的重组可构建不同拓扑结构的 ELPs, 包括圆型、蝌蚪状、星型、H 型[20], 极大丰富了传统线性 ELPs 的结构形式. 目前已有研究者将 ELPs 通过 SpyTag-SpyCatcher 自发交联构建网状 ELPs 用于制备具有生物活性的蛋白水凝胶, 可作为固定化人造细胞的外基质, 使细胞保持原有特性[21]. 这些拓扑结构各异的 ELPs 拓展了其应用领域. 然而, 有关这些拓扑结构的 ELPs 相变特性及 SpyTag 和 SpyCatcher 对 ELPs 相变温度的影响规律尚未见报道. 了解所融合蛋白对 ELPs 相变温度的影响可合理优化可逆相变循环(inverse transition cycling, ITC)的纯化过程; 此外, 充分理解所融合蛋白特性对理性设计刺激响应分子开关有重要作用[22,23], 而且, 不同拓扑结构 ELPs 相变行为的研究也为进一步了解其分子结构和功能之间的关系奠定了理论基础.

本研究利用所设计的 ELP_{40} (KV_8F-40)分别与 SpyTag-SpyCatcher 融合, 经表达、纯化后二者按 1:1 混合即可发生反应形成带有异肽键的新型拓扑结构的 ELPs (三臂星型 ELPs). 在不同盐类型及浓度下, 系统研究了各融合 ELPs 及线性 ELPs 的相变特性并进行了比较. 结果发现, 三臂星型 ELPs 相变温度明显升高; 其中, 融合了 SpyCatcher 的 ELP_{40} 在低浓度 Na_2CO_3时, 其相变特性异常, 不符合 Hofmeister 效应, 报道如下.

2 实验部分

2.1 载体构建

E.coli BL21(DE3)、pUC-19-ELP_{40}、pET-22b(+)、ELP_{40} (KV_8F-40)、ELP_{80} (KV_8F-80)、ELP_{120} (KV_8F-120)菌种为本实验室保存. 生工生物工程(上海)有限公司分别合成并测序 SpyTag 和 SpyCatcher 基因[20], 与 ELP_{40} 相连, 成功构建了 pET-SpyCatcher-ELP_{40} 和 pET-ELP_{40}-SpyTag-ELP_{40} 载体(图 1); 将上述两个载体分别导入表达宿主菌 *E.coli* strains BL21 (DE3). ELP_{40} 和 SpyTag 以及 ELP_{40} 和 SpyCatcher 之间分别插入 linker (GSSGSGSGSGSG), 目的是为了减少二者之间的相互干扰[24].

2.2 蛋白质的表达和纯化

携带上述重组质粒的 BL21 (DE3)在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃、250 r/min 过夜培养, 然后按照 1:100 接种到 TB 培养基中, 37℃、250 r/min 培养至光密度(OD_{600})为 0.5~0.6 时, 加入适量的异丙基硫代-β-*D*-半乳糖苷(IPTG), 20℃诱导表达 24 h, 离心(4℃、8000 r/min、10 min)收获菌体. 用预冷的磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)重悬菌体, 洗涤离心, 再加 PBS 重悬菌体, 置于冰浴中超声破碎(超声 2 s, 间隔 4 s, 8 min), 4℃离心(12000 r/min, 10 min)去除沉淀.

蛋白 SpyCatcher-ELP_{40} (EA, E 表示 ELP_{40}, A 表示 SpyCatcher, 图 1(a))和 ELP_{40}-SpyTag-ELP_{40} (EBE, E 表示 ELP_{40}, B 表示 SpyTag, 图 1(b))的纯化与线性 ELPs 相似, 均采用 ITC[4], 在纯化过程中, 通过添加 NaCl (2.5 mol/L)触发 ELPs 相变. 经过 2~3 轮 ITC 纯化, 即可得到高纯度的线性 ELPs、EA 和 EBE.

2.3 EA 和 EBE 的反应

经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)纯度验证的 EA 和 EBE 按浓度比 1:1 在 37℃下反应 3 h[18], 经由 SpyTag 和 SpyCatcher 之间的自发反应形成异肽键而共价连接, 形成的产物为 EA+EBE, 称为三臂星型 ELPs (图 1(c)).

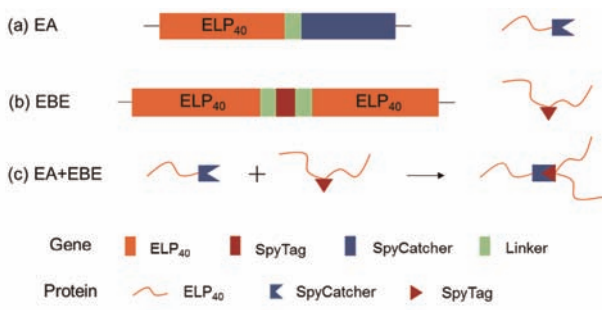


图 1 基因结构以及相应蛋白示意图(网络版彩图)

2.4　SpyTag-SpyCatcher 的表面特性

通过 SWISS-MODEL 同源建模的方法[25], 构建了所融合的 SpyTag、SpyCatcher 的 3D 结构. 经过 BLAST 序列比对, 发现同源建模的模板(ID 号: 4mls)[26]和 SpyTag-SpyCatcher 的序列相似度均为 100%. 这是由于我们使用的 SpyTag 和 SpyCatcher 是参考该文献所得, 同源建模结果可靠. 模板的晶体结构经 X 射线(X-ray)测得, 分辨率为 1.98 Å, 其结构如图 2(a)所示. SpyTag-SpyCatcher、SpyTag 和 SpyCatcher 表面的电荷分布由 Accelrys discovery studio 4.5 visualizer 计算所得(图 2(b)~(d)).

2.5　融合蛋白的特性

EA、EBE 和 EA+EBE 的纯度通过 SDS-PAGE 验证, 其分子量利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS, Bruker Daltonics Inc., 美国), 以芥子酸为基质进行测定. 利用紫外分光光度计(Analytik Jena AG, 德国)测定 Trp 在 280 nm 处的消光系数, 建立标准曲线. 纯化的蛋白在 280 nm 处的消光系数与标准曲线对比可得到浓度的定量[27]. 盐对相变温度(指 OD_{350} 最大值的一半所对应的温度[22])影响的测定: ELPs 和融合蛋白(终浓度 25 μmol/L)与不同盐浓度混匀后, 在配置有温控装置的紫外-可见分光光度计, OD_{350} 处, 通过程序升温(1℃/min)测定不同温度下的浊度.

2.6　融合蛋白粒径的测定

在不同浓度 Na_2CO_3 和 Na_2SO_4 溶液中, EA 的平均粒径大小和粒径分布由纳米激光粒度仪(Malvern Instruments, Worcestershire, 英国)测定[28]. 配置的参数为: 散射角 173°, HeNe 激光器(633 nm), 输出功率 10 mW. 每个样品中 EA 的浓度为 25 μmol/L, 上样前用 0.22 μm 聚偏氟乙烯(PVDF)针筒式滤器过滤, 然后在所测定样品的相变温度下稳定 5 min.

3　结果与讨论

3.1　不同拓扑结构 ELPs 表达纯化及分子鉴定

经表达纯化所得的 EA、EBE 和 EA+EBE 通过 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF-MS 质谱仪来验证, 结果如图 3 所示. 图 3(a)显示了经两轮 ITC 分离纯化的 EA、EBE 和二者反应后的 EA+EBE. 由实验结果可

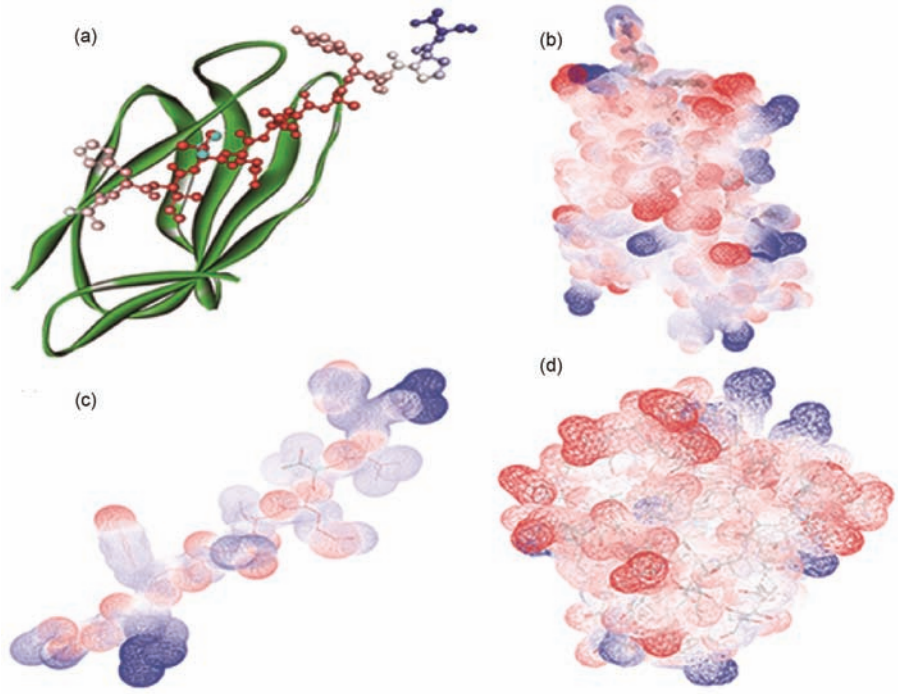


图 2　(a) SpyTag-SpyCatcher 结构条带图(PDB 号: 4mls); (b~d) 分别为 SpyTag-SpyCatcher、SpyTag 和 SpyCatcher 蛋白可及表面电荷分布(红色是负电, 蓝色是正电) (网络版彩图)

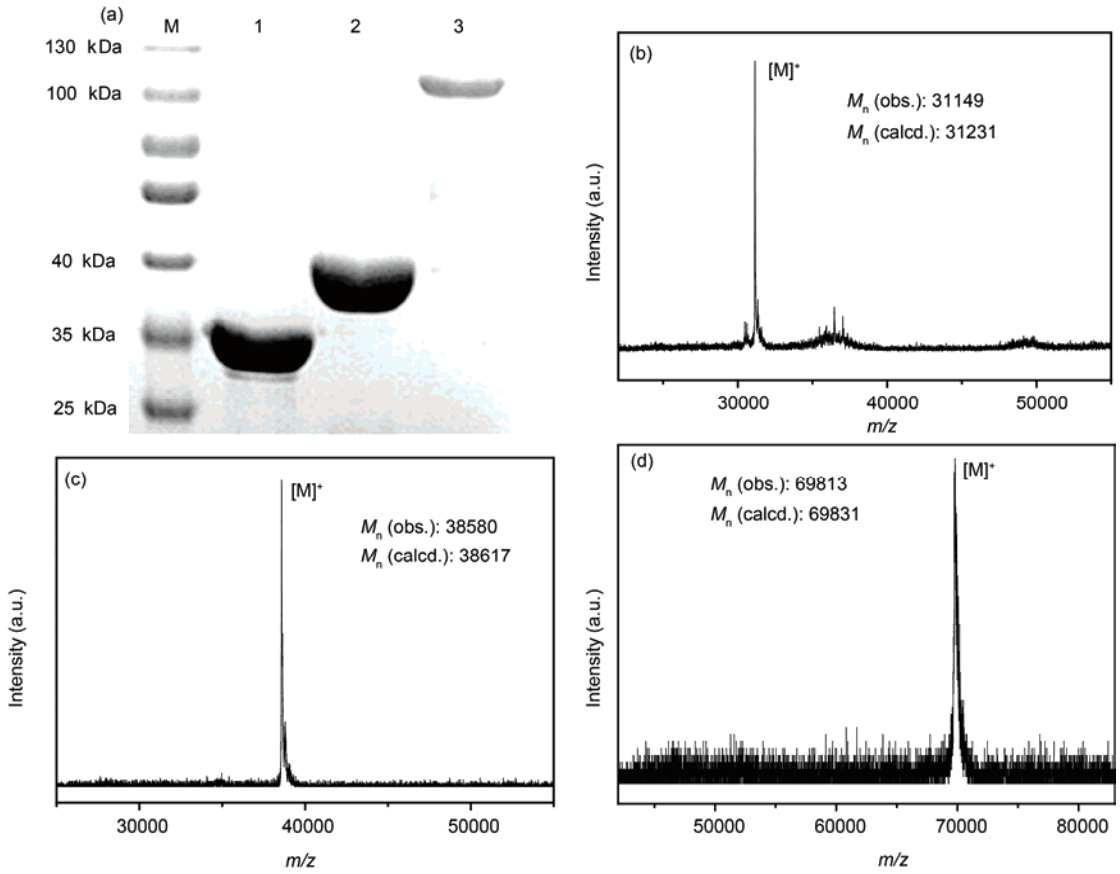


图 3 (a) ITC 纯化的 EA、EBE 及二者反应产物 EA+EBE 的 SDS-PAGE 分析; (b~d) 分别为 EA、EBE 和 EA+EBE 的质谱图

知, 用 2.5 mol/L NaCl 经两轮 ITC 纯化的效果较好, 条带清晰, 无杂质. 另外, EA 和 EBE 经过 37℃、3 h 的充分反应, 得到了单一条带. MALDI-TOF-MS 质谱图(图 3(b)~(d))分别在 *m*/*z* 31149、38580 和 69813 处显示一个主要的峰, 其理论值分别为 31231、38617 和 69831, 二者之间的误差分别为 0.26%、0.09%和 0.02%. 表明测定值和理论计算值非常接近, 这同样说明基因序列成功构建, 所得分子与预期符合, 可用于后续研究. 而图 3(a)中的泳道 3 滞后了 30 kDa 左右, 则是由于 EA+EBE 三臂星型的特殊拓扑结构所致[20]. 不同长度的线性 ELPs (ELP_{40}、ELP_{80} 和 ELP_{120})的纯度及分子鉴定在本课题前期已经进行了研究[29].

3.2 盐对不同拓扑结构 ELPs 相变温度的影响

以 NaCl 和 Na_2CO_3 为例, 测定它们对不同拓扑结构 ELPs 相变温度的影响(图 4). 图 4 结果表明, 盐浓度对不同拓扑结构 ELPs 相变温度的影响呈线性相关, 这与传统线性 ELPs 趋势相似[30]. 图 4(a)显示, 随着 NaCl 浓度的增加, 相变温度呈直线下降. EA 和 EA+EBE 的相变温度在相同 NaCl 浓度下比相应线性 ELP_{40} 和 ELP_{120} 均明显高, 而 EBE 则和 ELP_{80} 相差较小. EA 与线性 ELP_{40} 所含 ELP 重复数均为 40, 但其相变温度存在一定差别, 平均相差 5.7℃, 在 2 mol/L 时最大相差 6.9℃; EBE 与线性 ELP_{80} 均含 80 个重复, 分子量接近, 且二者相变温度接近, 平均相差 1.0℃, 在 1 mol/L 相差最大(3.0℃). 这可能是由于 SpyTag 仅有 13 个氨基酸, 处于两个 ELP_{40} 分子中间, 经 linker 与 ELP_{40} 相连(图 1(b)), 故对两端 ELP_{40} 结构影响较小, 因此整体性状与线性 ELP_{80} 非常接近; 虽然 EBE+EA 含有 3 个 ELP_{40} 的结构与线性 ELP_{120} 所含 ELP 重复数相同, 但二者的相变温度相差较大. EBE+EA 的相变温度明显高于 ELP_{120}, 平均相差 8.4℃, 在 0.2 mol/L 时相差最大(9.1℃). 可见, 相比于 SpyTag, SpyCatcher 对 ELPs 相变的影响更大. 相似的斜率说明, NaCl 对相变温度的作用不受分子量、融合蛋白以及拓扑结构类型的影响. 对 EBE 和

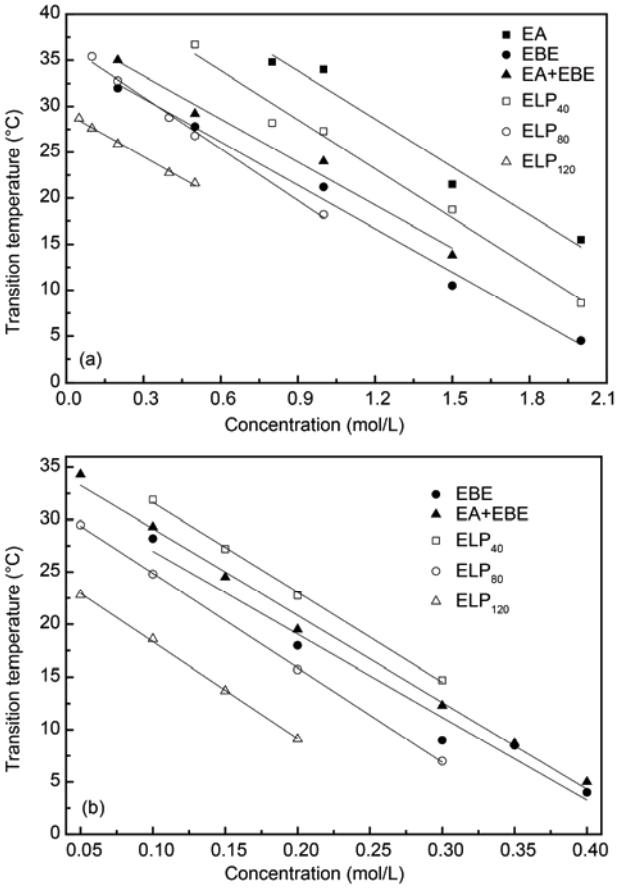


图 4　盐类型和浓度对不同结构 ELPs 相变温度的影响. (a) NaCl; (b) Na_2CO_3

EBE+EA 而言, Na_2CO_3 浓度对其相变温度也有类似的现象(图 4(b)), 即所含 ELP 重复数相同的情况下, EBE 和 EBE+EA 的相变温度均高于相应的线性 ELPs. 例如, 与 ELP_{80} 相比, EBE 相变温度平均提高了 2.6℃, 在 0.1 mol/L 时相差最大, 为 3.4℃; 而 EBE+EA 的相变温度也均高于 ELP_{120}, 其平均相差 10.9℃, 在 0.05 mol/L 时最大相差 11.5℃. 相同浓度 NaCl 和 Na_2CO_3, 虽然后者电离后 Na^+是前者的 2 倍, 但即使二者具有相同的电离 Na^+浓度, Na_2CO_3 对 ELPs 融合蛋白的相变温度的影响仍然比 NaCl 大; 图 4(a)和(b)结果对比显示, 在 Na_2CO_3 浓度为 0.25 mol/L 时, 不同拓扑结构 ELPs 的相变温度为 4.6~18.8℃; 而 NaCl 浓度为 0.5 mol/L 时, 不同拓扑结构 ELPs 的相变温度为 21.4~40.8℃. 另外, Hofmeister 离子序中, 阳离子对 ELPs 的相变温度的影响很弱[31]. 由此可见, 相比于 NaCl, Na_2CO_3 对 ELPs 融合蛋白的影响更大.

融合外源蛋白后的 ELPs 相变温度与未融合时存在一定差异, 所融合蛋白质溶剂可及表面的氨基酸(即 Glu、Asp、Lys 和 Arg)电荷是影响 ELPs 相变温度的最重要因素[23]. 通过 Accelrys discovery studio 4.5 visualizer 计算了 SpyCatcher-SpyTag、SpyTag 和 SpyCatcher 表面的电荷分布(中性条件), 结果如图 2(b)~(d)所示. 由图可知, SpyCatcher-SpyTag、SpyTag 和 SpyCatcher 表面分布大量的正电荷和负电荷, 且负电荷多于正电荷, 负电荷以 Asp 和 Glu 酸性氨基酸为主, 正电荷以 Arg 和 Lys 为主. 根据报道, 融合蛋白表面带电氨基酸数越多, 其表面指数(surface index, SI)就越大. 因此, ELPs 融合蛋白的相变温度也会越高[23,32]. 这就是 EA、EBE 和 EA+EBE 的相变温度高于相应线性 ELPs 的原因.

3.3　EA 相变特性的异常

值得注意的是, 图 4(b)并没有显示 Na_2CO_3 对 EA 相变温度的影响. 这是因为图中所列的 Na_2CO_3 浓度并未引起 EA 相变, 而等浓度的 Na_2CO_3 溶液中与其重复数相同的 ELP_{40} 则发生了明显相变现象. 为此, 选取了 Na_2SO_4 作为下一个引起 EA 相变的阴离子. 一般情况下, 相比 SO_4^{2-}, 相同浓度的 CO_3^{2-}使 ELPs 的相变温度更低[31]. Na_2SO_4 和 Na_2CO_3 对 EA 相变温度的影响如图 5(a)所示. 由图可知, 当 Na_2CO_3 浓度达到 0.5 mol/L 时 EA 中 ELPs 才发生相变, OD_{350} 最大值只有 0.8. 而 Na_2SO_4 在浓度为 0.1 mol/L 时已经有明显相变, 在 0.4 mol/L 时的相变温度为 17.0℃. 说明在浓度小于 0.5 mol/L 时, SO_4^{2-}对 EA 的离子效应比 CO_3^{2-}强, 这一现象违背了 Hofmeister 离子序. 但线性 ELP_{40} 在同浓度的 Na_2CO_3 或 Na_2SO_4 下表现为正常的 Hofmeister 离子序(图 5(b)). 对比图 5 发现, 在同浓度 Na_2CO_3 (浓度≤0.4 mol/L)条件下, ELP_{40} 在极短时间内发生相变且现象十分明显, 而 EA 并未有任何相变现象. 同样, 与 Na_2CO_3 浓度(≤0.4 mol/L)相等的 Na_2SO_4 也会让 EA 中 ELP_{40} 发生相变, EA 的相变温度比 ELP_{40} 平均高 4.0℃. 以上结果说明, EA 中 SpyCatcher 的存在是引起 EA 中 ELP_{40} 相变异常的重要因素. 研究表明, 在低盐浓度和 pH<pI (pI 为等电点)的条件下, 一些蛋白(如溶菌酶)表现为逆 Hofmeister 离子序; 高盐浓度下又恢复正常; 在 pH>pI, 则遵循正常的 Hofmeister 离子序[33~35]. 而本研究中所用的磷酸盐缓冲液 PBS 的 pH 为 7.4, 通过

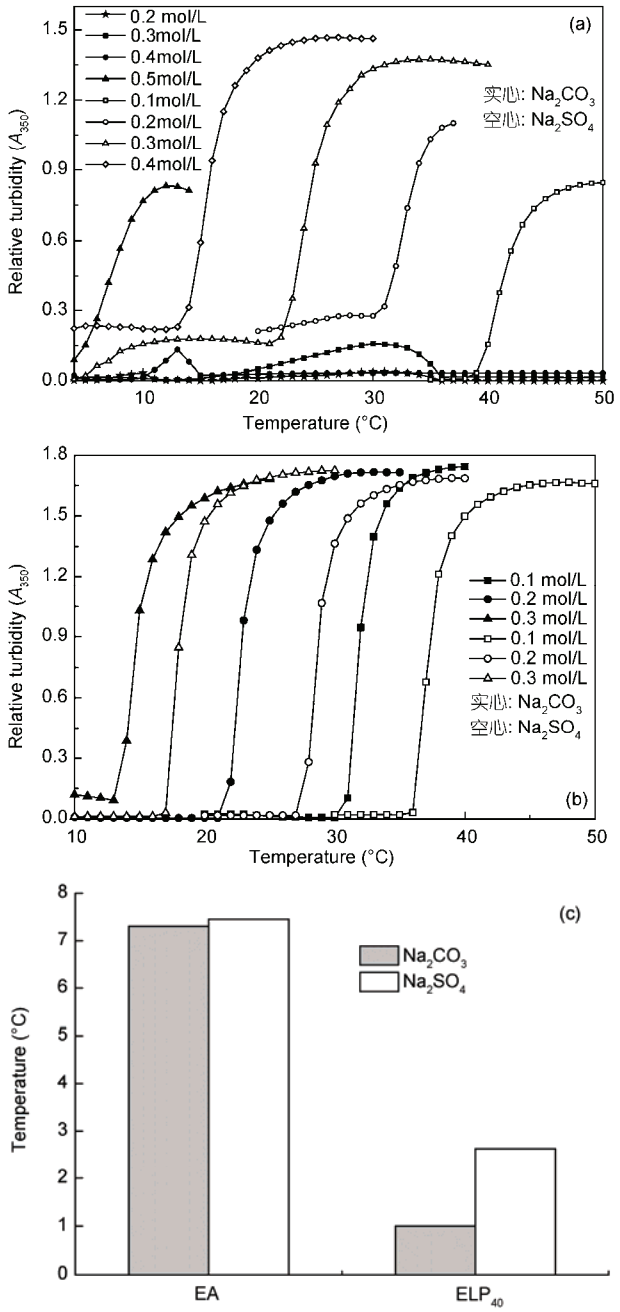


图 5 盐类型和浓度对 EA 和 ELP_{40} 相变温度的影响. (a) Na_2CO_3 和 Na_2SO_4 对 EA 相变温度影响; (b) Na_2CO_3 和 Na_2SO_4 对 ELP_{40} 相变温度的影响; (c) 0.5 mol/L 的 Na_2CO_3 和 Na_2SO_4 对 EA 和 ELP_{40} 相变温度的影响

计算(http://web.expasy.org/protparam) EA 的 pI 是 4.87, 即 EA 所处溶液的 pH>pI, 理论上符合 Hofmeister 离子序. 此外, 这些文献仅对一价阴离子(即 Cl^-、Br^-、NO_3^-、I^-、SCN^-)的逆 Hofmeister 离子序进行了研究, 对二价阴离子(即 CO_3^{2-}、SO_4^{2-})的逆 Hofmeister 离子序目前未见报道, 本文报道的 EA 对 CO_3^{2-}、SO_4^{2-}阴离子反常的响应现象填补了这一空白.

根据 Cho 等[31]研究 Hofmeister 离子序中的阴离子对 ELPs 相变温度的影响, CO_3^{2-}、SO_4^{2-}被称为 Kosmotrope 型离子, 它通过极化的水分子, 减弱水分子和 ELPs 形成的氢键, 引起 ELPs 盐析(salting-out)效应. 根据这一解释, CO_3^{2-}是最易引起盐析的二价阴离子, SO_4^{2-}次之. ELP_{40} 在融合 SpyCatcher 之后并未在低浓度 CO_3^{2-}存在的情况下发生相变. 只有 CO_3^{2-}浓度达到 0.5 mol/L 后才有相变, 并且在较低的温度下发生相变, 而与线性 ELPs、三臂星型 ELPs 及其他含有融合蛋白的 ELPs (呈现线性递减趋势, 图 4). 图 5(c) (数据由线性拟合得出, 符合低温下即相变的现象)表明, 在 0.5 mol/L 的 CO_3^{2-}或 SO_4^{2-}下, EA 的相变温度明显高于相应的线性 ELP_{40}; SO_4^{2-}溶液中 EA 的相变温度略高于 CO_3^{2-}, 二者仅相差 0.15℃.

为了进一步证实这一异常现象, 利用动态光散射测量了不同浓度 Na_2CO_3、Na_2SO_4 下 EA 的粒径大小和分布情况, 以进一步对 EA 相变异常现象进行研究(图 6 和图 7). 由图 6 可知, Na_2CO_3 浓度低于 0.4 mol/L 时, EA 的平均粒径小于 65.71 nm, 与纯的 PBS 缓冲液粒径接近, 结合文献研究其他类型 ELPs 的粒径观察到的现象[36], 可进一步确认此时 EA 未发生相变. 而当 Na_2CO_3 浓度为 0.5 mol/L 时, EA 的平均粒径达到 249.3 nm, 有明显聚集现象, 并形成稳定均匀的颗粒. Na_2SO_4 对 EA 所形成颗粒粒径的影响如图 7 所示. 4 种 Na_2SO_4 浓度下, EA 均形成大小不同的颗粒, 其粒径均显著大于 Na_2CO_3 溶液中 EA 的粒径. 由峰宽值可知, 粒径的分布范围较大, 属于多分散系. 综合 OD_{350} 及动态光散射的结果可以进一步确定, EA 在较低浓度的 Na_2CO_3 溶液中并未表现出响应温度而发生自组装聚集现象, 而此时的 Na_2SO_4 溶液中的 EA 已经发生了明显的相变现象(图 5(a)). 即使将温度增加到 80℃ (图 5(a)中数据未全部列出), 依然未能观察到 EA 的相变. 可见, 低浓度 CO_3^{2-}无法让 EA 发生相变, 而等浓度的 SO_4^{2-}则使 EA 发生明显相变, 此现象明显不符合 Hofmeister 离子序, 也从未在线性 ELPs 以及其他融合了外源蛋白的 ELPs 中观察到, 值得深入分析.

结合相关文献[31,37]和 SpyCatcher 的特性, 我们推测出现这一现象的原因是 EA 中 SpyCatcher 的 pI

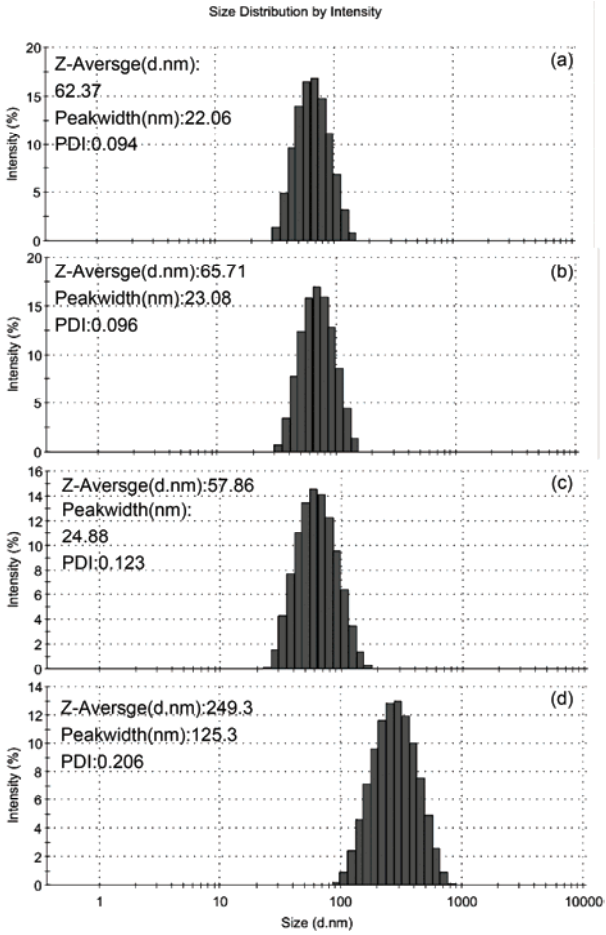


图 6　Na_2CO_3 对 EA 粒径分布的影响. (a) 0.2 mol/L; (b) 0.3 mol/L; (c) 0.4 mol/L; (d) 0.5 mol/L. Z-Aversge: 聚集体平均粒径; Peak width: 聚集体峰宽; PDI: 分布系数

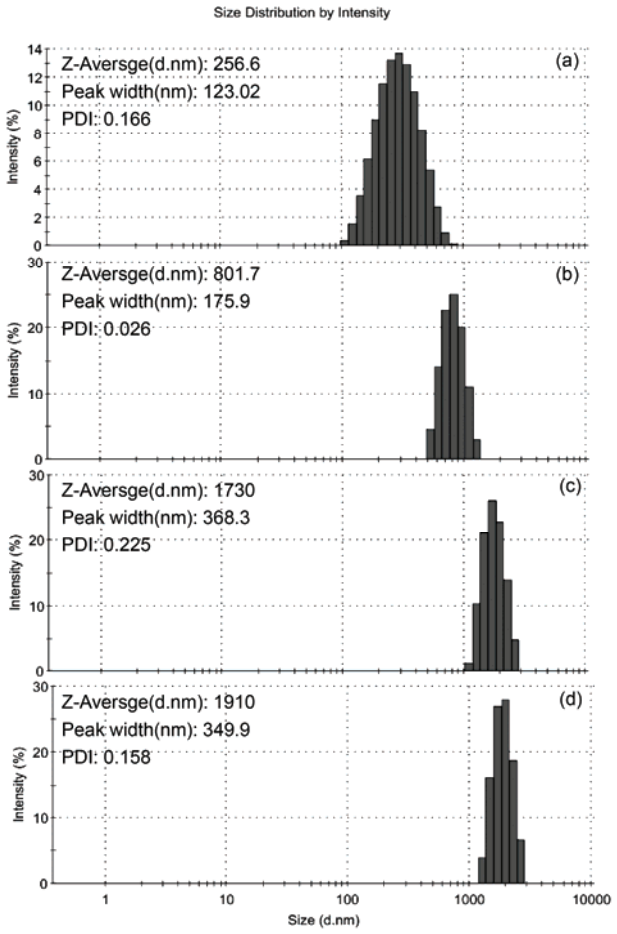


图 7　Na_2SO_4 对 EA 粒径分布的影响. (a) 0.1 mol/L; (b) 0.2 mol/L; (c) 0.3 mol/L; (d) 0.4 mol/L

为 4.38 (http://web.expasy.org/protparam), 在 pH 7.4 的磷酸缓冲液和 CO_3^{2-}碱性阴离子存在的情况下(如 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 pH 为 10.2)带有大量的负电荷, 因此 EA 周围形成负电荷层. 负电荷层保护了水分子和 EA 形成的氢键, CO_3^{2-}被阻挡在外面不能极化水分子, 进而不能减弱水分子与 ELPs 形成的氢键, 因此 EA 不会发生相变行为. 随着添加的 CO_3^{2-}浓度不断增大(≥0.5 mol/L 时, 溶液 pH≥11.2), 负电荷层内外 CO_3^{2-}的浓度差增大, 超过了静电斥力, 因而 CO_3^{2-}进入负电荷层, 进而极化水分子, 破坏氢键, 从而引起 EA 的相变. SO_4^{2-}是中性离子, 添加入 EA 溶液中不会对溶液的 pH 有大的影响, 因此 EA 周围的负电荷层相对就会减弱, SO_4^{2-}可以极化水分子进而引起 EA 的相变. 对其机理深入研究可借助分子动力学模拟及其他实验或计算手段进一步探究和证实.

3.4　盐对三臂星型 ELPs 相变特性的影响

EA 和 EBE 按 1:1 反应生成 EA+EBE, 对此三臂星型 ELPs 进行阴离子效应的研究结果如图 8 所示. 此图所反应的情况与图 5(a)明显不同. Na_2CO_3 在浓度低至 0.05 mol/L 时, 该三臂星型 ELPs 发生了相变, 且相变温度为 34.2℃. 同时, Na_2CO_3 和 Na_2SO_4 在 0.2 mol/L 时的相变温度分别为 19.5 和 21.5℃, 在 0.3 mol/L 时的相变温度分别为 12.4 和 13.0℃; 说明 Hofmeister 离子序在 0.2 mol/L 以上均正常化, 即 Na_2CO_3>Na_2SO_4. 而在 Na_2CO_3 和 Na_2SO_4 浓度为 0.05 mol/L 时的相变温度分别为 34.2 和 34.3℃, 浓度为 0.1 mol/L 时的相变温度分别为 29.3 和 29.4℃; 二者几乎相等, 未表现出明显的 Hofmeister 离子序. 另外,

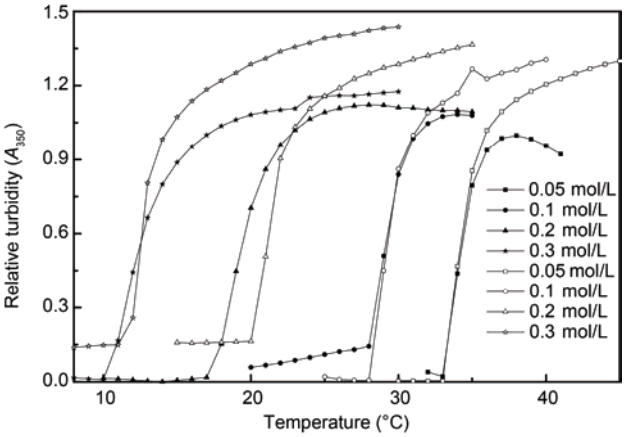


图 8 Na_2CO_3 (实心)和 Na_2SO_4 (空心)对 EA+EBE 相变温度的影响

NaCl 在 0.2 mol/L 时的 EA+EBE 相变温度为 35.0℃(图 4(a)), 远大于同浓度下 Na_2CO_3 溶液中 EA+EBE 的相变温度(19.5℃). 这仍然可能与 EA 的特殊氨基酸组成及结构密切相关. 由于 SpyTag 和 SpyCatcher 反应后, 将 3 个 ELP_{40} 联系在一起, 形成一个三臂星型结构[20], SpyTag-SpyCatcher 被 3 个 ELP_{40} 包围处于中间位置. 当 3 个 ELP_{40} 发生聚集时, SpyTag-SpyCatcher 就被完全包围在一个狭小的空间中, 单个聚集的 EA+EBE 和其他更多的 EA+EBE 结合, 形成大的聚集体. 在此情况下, 由于 SpyTag-SpyCatcher 使 ELP_{40} 的相变温度升高, 因此 EA+EBE 的相变温度也会升高. 所谓的负电荷层也会由于 3 个 ELP_{40} 的影响而大大减弱. 综上所述, 添加低浓度 Na_2CO_3 后, EA+EBE 出现相变, 随着 Na_2CO_3 浓度的不断增加, EA+EBE 的相变温度也呈现线性递减趋势. 这也说明三臂星型结构的 EA+EBE 表现出类似线性 ELPs 的行为.

4 结论

通过对高纯度 EA、EBE 和 EA+EBE 的相变特性进行研究, 并将其与相应线性 ELPs 进行比较, 结果发现 SpyTag-SpyCatcher 可以使 ELP_{40} 的相变温度升高. 因为 SpyTag-SpyCatcher 表面分布大量带电的氨基酸. 同时, 在低浓度 Na_2CO_3 时, EA 未发生相变; 当 Na_2CO_3 浓度在 0.5 mol/L 及以上时, 其相变会在温度很低时出现, 相变温度未像线性 ELPs 呈现直线下降趋势. 这主要归结于 SpyCatcher 表面带有大量负电荷, 少量 CO_3^{2-} 不能进入负电荷层; 当 CO_3^{2-} 浓度增大时, 浓度梯度克服了电荷的影响, 从而使得 EA 中 ELP_{40} 和水分子形成的氢键被极化, 导致发生相变. 此外, 与 EA 不同, 三臂星型结构 EA+EBE 在 Na_2CO_3 存在时相变没有发生异常, 其变化趋势与线性 ELPs 相似, 但相变温度比相应线性 ELPs 高, 在 Na_2CO_3 溶液中相差更大, 这也与 EA 的特殊结构有关.

致谢 本工作得到美国杜克大学 Ashutosh Chilkoti 教授理论知识方面的帮助和指导, 特此致谢.

参考文献

1 Urry DW, Trapane TL, Prasad KU. *Biopolymers*, 1985, 24: 2345–2356
2 Urry DW. *J Phys Chem B*, 1997, 101: 11007–11028
3 Meyer DE, Chilkoti A. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 846–851
4 Christensen T, Amiram M, Dagher S, Trabbic-Carlson K, Shamji MF, Setton LA, Chilkoti A. *Protein Sci*, 2009, 18: 1377–1387
5 Kostal J, Mulchandani A, Gropp KE, Chen W. *Environ Sci Technol*, 2003, 37: 4457–4462
6 Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 37–45
7 Lao UL, Kostal J, Mulchandani A, Chen W. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1263–1268
8 Rao SQ, Zang XY, Yang ZQ, Gao L, Yin YQ, Fang WM. *Protein Expres Purif*, 2015, 118: 113–119
9 Wang W, Jashnani A, Aluri SR, Gustafson JA, Hsueh PY, Yarber F, Mckown RL, Laurie GW, Hamm-Alvarez SF, Mackay JA. *J Control Release*, 2015, 199: 156–167
10 Koria P, Yagi H, Kitagawa Y, Megeed Z, Nahmias Y, Sheridan R, Yarmush ML. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 1034–1039
11 Chow D, Nunalee ML, Lim DW, Simnick AJ, Chilkoti A. *Mater Sci Eng*: *R Rep*, 2008, 62: 125–155
12 Martín L, Alonso M, Girotti A, Arias FJ, Rodríguez-Cabello JC. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 3015–3022
13 Macewan SR, Chilkoti A. *J Control Release*, 2014, 190: 314–330
14 Strzegowski LA, Martinez MB, Gowda DC, Urry DW, Tirrell DA. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 813–814

15 Urry DW. Haynes B, Harris RD. *Biochem Bioph Res Co*, 1986, 141: 749–755
16 Hofmeister F. *Arch Exp Pathol Pharmakol*, 1888, 24: 247–260
17 黄凯宗, 李晶晶, 李巍, 葛慧华, 王文研, 张光亚. 生物工程学报, 2011, 27: 653–658
18 Zakeri B, Fierer JO, Celik E, Chittock EC, Schwarz-Linek U, Moy VT, Howarth M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E690–E697
19 Zakeri B, Howarth M. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 4526–4527
20 Zhang W, Sun F, Tirrell DA, Arnold FH. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 13988–13997
21 Sun F, Zhang WB, Mahdavi A, Arnold FH, Tirrell DA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 11269–11274
22 Lim DW, Trabbic-Carlson K, Mackay JA, Chilkoti A. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1417–1424
23 Christensen T, Hassouneh W, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 1514–1519
24 Chen X, Zaro JL, Shen WC. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65: 1357–1369
25 Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195–201
26 Li L, Fierer JO, Rapoport TA, Howarth M. *J Mol Biol*, 2014, 426: 309–317
27 Gill SC, Hippel PH. *Anal Biochem*, 1989, 182: 319–326
28 Li CC, Zhang GY. *J Biotechnol*, 2014, 177: 60–66
29 葛慧华, 王文研, 张光亚, 王士斌. 生物工程学报, 2014, 30: 1274–1282
30 Reguera J, Urry DW, Parker TM, Mcpherson DT, Rodriguez-Cabello JC. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 354–358
31 Cho Y, Zhang YJ, Christensen T, Sagle LB, Chilkoti A, Cremer PS. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 13765–13771
32 Urry DW. *Chem Phys Lett*, 2004, 399: 177–183
33 Finet S, Skouri-Panet F, Casselyn M, Bonneté F, Tardieu A. *Curr Opin Colloid In*, 2004, 9: 112–116
34 Boström M, Tavares FW, Finet S, Skouri-Panet F, Tardieu A, Ninham BW. *Biophys Chem*, 2005, 117: 217–224
35 Zhang YJ, Cremer PS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15249–15253
36 Ghoorchian A, Cole JT, Holland NB. *Macromolecules*, 2010, 43: 4340–4345
37 Zhang YJ, Cremer PS. *Annu Rev Phys Chem*, 2010, 61: 63–83

The phase transition of elastin-like polypeptides with different topological structures

Dandan Zhang, Zhengwen Cai, Jindan Wang, Xinzhe Wang, Shuyu Wu, Guangya Zhang*

Department of Bioengineering and Biotechnology, School of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China
**Corresponding author (email: zhgyghh@hqu.edu.cn)*

Abstract: In this study, we constructed elastin-like polypeptides (ELPs) fusion proteins with different topological structures and investigated the effects of salts types and concentrations on the phase transition of the fusion proteins. Results showed that the phase transition temperature of ELPs fusion protein with different typologies varied from 1 to 10.9 °C under different salt concentrations, which was higher than that of their corresponding linear ELPs. Among them, the maximum difference was observed when the concentration of Na_2CO_3 was 0.05 mol/L with a disparity value of 11.5 °C. Meanwhile, the transition temperature decreases linearly as a function of the salts concentrations. However, no phase transition was observed in SpyCatcher-ELP_{40} under low concentration (≤0.4 mol/L) of Na_2CO_3, but it was significant in the NaCl, Na_2SO_4 solution with the same concentration; while, under high concentration (≥0.5 mol/L) of Na_2CO_3 solution, the phase transition temperature dropped dramatically to 7.3 °C which was only 0.15 °C lower than that of Na_2SO_4 solution with the same concentration. This result was obviously inconsistent with the Hofmeister series. The possible reason was related with the amino acids with positive and negative charges distributed on the surface of SpyCatcher. We also addressed the possible mechanism of how this phenomenon occurred.

Keywords: elastin-like polypeptides, SpyTag-SpyCatcher, Hofmeister series, transition temperature, topological structure of protein

doi: 10.1360/N032016-00002