

## 基于多重非共价相互作用的荧光融合蛋白质微米环\*

胡榕婷<sup>1†</sup> 王 珏<sup>1†</sup> 杨 静<sup>1</sup> 丁 灏<sup>2\*\*</sup> 陈国颂<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>复旦大学高分子科学系 聚合物分子工程国家重点实验室 上海 200438)

(<sup>2</sup>复旦大学生命科学学院 上海 200438)

**摘 要** 利用蛋白质融合技术, 将绿色荧光蛋白(GFP)与可二聚化的链酶亲和素突变体(SA)融合, 形成二聚化融合蛋白质GFP-SA, 并以此作为生物大分子自组装的构筑基元. 同时, 设计并合成了相应的配体分子RhYBio<sub>2</sub>, 该配体中的2个生物素分子能特异性结合相邻融合蛋白中的SA, 并将2个以上的二聚化融合蛋白GFP-SA排列成纳米线, 随后该纳米线再通过配体中的罗丹明B分子二聚, 进一步组装形成荧光蛋白质微米环. 采用动态光散射(DLS)对其粒径及分布进行了表征, 并利用透射电子显微镜(TEM)和激光共聚焦显微镜(confocal microscope)观察了组装体的形貌, 即蛋白质微米环, 其形貌规整并具有较强的荧光.

**关键词** 融合蛋白, 绿色荧光蛋白, 自组装, 微米环

随着分子生物技术近几年的迅速发展, 将不同功能的蛋白质按照特定规则进行设计并连接, 形成具有复合功能的融合蛋白(fusion protein)已得到广泛应用, 该方法通过DNA重组表达技术, 得到2个或多个基因功能叠加的表达产物(蛋白质), 使得研究者突破了只能对天然蛋白质进行修饰的局限, 将对蛋白质的操纵引入了一个新的纪元. 融合蛋白是由至少2个结构域所组成的蛋白质, 每个独立结构域由被连接的单独基因编码, 最终作为一个整体转录和翻译, 产生单个多肽. 利用融合蛋白技术, 可构建和表达出具有2种(或多种)结构域的目的蛋白, 进而创造出具有多功能的新型融合蛋白质材料<sup>[1-4]</sup>. 这些通过融合蛋白质组装成的材料可以保留或改善原蛋白质的生物功能, 不仅给我们提供了一个理解天然蛋白质精确组装过程的机会, 而且还赋予我们一种获得先进材料的途径.

调控蛋白质之间的非共价相互作用是构筑蛋白质组装体的重要策略<sup>[5]</sup>, 科学家们所利用的非

共价相互作用包括蛋白质-配体相互作用<sup>[6-8]</sup>, 静电相互作用<sup>[9-11]</sup>和金属配位相互作用<sup>[12-15]</sup>等. 近年来, 我们课题组提出了通过设计合成的“诱导配体”小分子所参与的双重非共价相互作用, 来调控蛋白质自组装, 即该诱导配体中除了含有能结合蛋白质的配体分子(如寡糖等), 还同时含有能够发生分子间二聚的部分(如罗丹明B). 这双重非共价作用是诱导蛋白质自组装形成规整结构的主要驱动力. 目前, 我们已成功利用该策略得到了三维晶体框架<sup>[16]</sup>、直径均一的蛋白质螺旋微米管<sup>[17]</sup>和规整的二维片层等<sup>[18]</sup>. 同时, 我们还实现了微米管的CO<sub>2</sub>响应性<sup>[19]</sup>, 并利用组装体形成与半乳凝素和T细胞结合的竞争, 抑制了T细胞聚集和凋亡<sup>[20]</sup>. 该方法充分利用了合成小分子的结构特点, 通过所设计的小分子结构, 调控了蛋白质组装体的形貌和蛋白质微观排列方式. 最近, 闫强课题组也利用该策略实现了对变构蛋白质组装体螺旋结构的调控<sup>[21]</sup>. 上述工作都是利用天然蛋白质来实现蛋白质的自组装. 为了拓展蛋白质

\* 2018-09-23收稿, 2018-11-15修稿; 国家自然科学基金(基金号 51322306)资助项目.

† 共同第一作者.

\*\* 通讯联系人, E-mail: yuding@fudan.edu.cn; guosong@fudan.edu.cn

本文附有电子支持材料, 与正文一并刊载在本刊网站<http://www.gfzxb.org>

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2018.18204

自组装的多样性, 也为了赋予组装体功能, 在本研究中, 我们选择了非天然的、经设计的绿色荧光融合蛋白质作为组装体的构筑基元, 利用多重非共价作用来实现蛋白质与配体之间的自组装。

我们纯化出了具有荧光特性的二聚化融合蛋白质——绿色荧光蛋白融合链酶亲和素蛋白GFP-SA, 并以此作为蛋白质组装体的组装基元; 再设计合成了配体RhYBio<sub>2</sub>, 通过配体中的生物素分子与融合蛋白质中SA的特异性结合, 同时利用配体中罗丹明B的二聚化, 最终获得了基于GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub>的微米环状组装体. 利用透射电子显微镜, 激光共聚焦显微镜等表征方法, 探究了基于荧光融合蛋白质的自组装结构和形貌, 并提出了其自组装机理。

## 1 实验部分

### 1.1 主要原料

罗丹明B (99%), 3,5-二羟基苯甲酸甲酯 (99%), 以上购自百灵威科技有限公司, 直接使用; 四甘醇 (99%)、生物素 (99%)、碳酸钾 (99%)、碘化钾 (99%), 以上购自国药集团化学有限公司。

### 1.2 表征方法

利用SDS-PAGE电泳设备(Bio-Rad公司的电泳仪及配套电泳槽)、分子体积排除色谱SEC (GE公司的Superdex 75 Increase)、凝胶渗透色谱(GPC)对蛋白质纯度和聚集状态进行表征, SEC与GPC均以缓冲溶液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)为流动相, 在室温下测定蛋白质聚集状态及其分子量; 采用基质辅助激光解吸电离-串联质谱仪(型号: 5800, AB SCIEX)、400 MHz傅立叶变换核磁共振波谱仪(型号: AVANCE III, Bruker), DMSO-d<sub>6</sub>为溶剂, TMS为内标, 对配体进行结构分析; 利用等温滴定热量仪(型号: Malvern ITC 200)在25 °C条件下滴定配体与蛋白质相互作用; 通过纳米粒度-Zeta电位分析仪器

(型号: Malvern ZS90-2026)、透射电子显微镜(型号: Philips CM120)、激光扫描共聚焦显微镜(型号: Nikon, A42)表征融合蛋白质组装体的形貌。

### 1.3 配体Rh4Bio的合成与表征

通过两步酯化反应, 合成了一端为生物素, 另一端为罗丹明B, 中间由具有3个重复单元的烷氧链连接而成的配体Rh4Bio(化合物S2). 合成路线如图1所示, 详细的合成方法如下。

#### 1.3.1 化合物S1的合成

将RhB (1.00 g, 2.00 mmol)、DMAP (20 mg)和TEG (1.22 g, 6.20 mmol)置于圆底烧瓶中, 加入DCM (60 mL)搅拌溶解, 冰浴30 min. 再向烧瓶中缓慢加入EDC·HCl (0.60 g, 3.20 mmol), 冰浴2 h后恢复至室温继续搅拌24 h. 待反应结束, 用饱和KHSO<sub>4</sub> (10 wt%)水溶液洗涤反应体系, 取有机相干燥、过滤并浓缩. 经湿法上样硅胶柱分离 (*V*(DCM):*V*(MeOH) = 20:1), 得紫红色泡沫状固体S1 (0.76 g, 产率55%)。

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 8.30 ~ 8.22 (dd, 1H; ArH), 7.98 ~ 7.80 (m, 2H; ArH), 7.54 ~ 7.46 (dd, 1H; ArH), 7.14 ~ 7.04 (dd, 2H; ArH), 7.04 ~ 6.94 (m, 4H; ArH), 4.64 ~ 4.54 (t, 1H; CH<sub>2</sub>), 4.12 ~ 4.00 (m, 2H; CH<sub>2</sub>), 3.74 ~ 3.56 (q, 9H; CH<sub>2</sub>), 3.54 ~ 3.35 (m, 12H; CH<sub>2</sub>), 1.34 ~ 1.10 (t, 12H; CH<sub>3</sub>)(见电子支持信息图S1)。

#### 1.3.2 化合物S2的合成

将化合物S1 (0.20 g, 0.31 mmol)、DMAP (25 mg)和Biotin (0.08 g, 0.31 mmol)置于茄形瓶中, 加入DMF (15 mL)搅拌溶解, 冰浴30 min. 再向体系中缓慢加入EDC·HCl (0.12 g, 0.61 mmol), 冰浴2 h后渐渐恢复至室温, 继续搅拌24 h. 待反应完成, 用旋转蒸发仪旋干DMF, 再加入DCM (40 mL)并用饱和KHSO<sub>4</sub> (10 wt%)水溶液洗涤, 取有机相干燥过滤. 经干法上样硅胶柱提纯(*V*(DCM):*V*(MeOH) = 10:1), 得紫色泡沫状固体化合物S2,

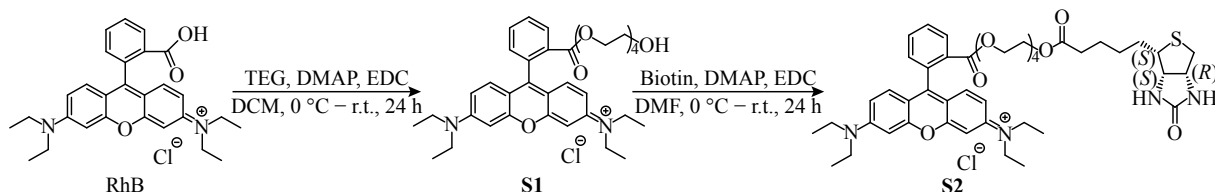


Fig. 1 Synthetic route to Rh4Bio

即配体Rh4Bio (0.12 g, 产率50%)。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 8.32 ~ 8.22 (dd, 1H; ArH), 8.22 ~ 8.12 (d, 1H; NH), 7.98 ~ 7.80 (m, 2H; ArH), 7.55 ~ 7.46 (dd, 1H; ArH), 7.14 ~ 7.04 (dd, 2H; ArH), 7.04 ~ 6.94 (m, 4H; ArH), 6.89 ~ 6.81 (d, 1H; NH), 6.46 ~ 6.32 (d, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 4.34 ~ 4.24 (m, 1H;  $\text{CH}_2$ ), 4.17 ~ 4.00 (m, 5H; CH +  $\text{CH}_2$ ), 3.74 ~ 3.58 (q, 9H;  $\text{CH}_2$ ), 3.58 ~ 3.33 (m, 12H;  $\text{CH}_2$ ), 3.09 ~ 3.03 (m, 1H;  $\text{CH}_2$ ), 2.85 ~ 2.76 (q, 1H;  $\text{CH}_2$ ), 2.62 ~ 2.54 (d, 1H;  $\text{CH}_2$ ), 1.70 ~ 1.27 (m, 6H;  $\text{CH}_3$ ), 1.27 ~ 1.10 (t, 12H;  $\text{CH}_3$ )(见电子支持信息图S2)。

#### 1.4 配体RhYBio<sub>2</sub>的合成与表征

设计并合成了配体RhYBio<sub>2</sub>, 这是一个结构像大写字母“Y”的小分子, 在“Y”的顶端分别连有2个生物素分子, “Y”的尾部通过酯化反应连接上罗丹明B. 在2个生物素分子之间有2段含3个

重复单元的烷氧链, 赋予整个分子足够的柔性, 便于配体中的2个生物素分子结合SA的位点(如图2中化合物S11). 合成路线如图2所示, 详细的合成方法如下。

##### 1.4.1 化合物S3的合成

将NaOH (0.50 g, 13.33 mmol)溶于去离子水 (20 mL)中, 逐滴加入TEG (6.00 g, 40.00 mmol)的THF (30 mL)溶液, 冰浴下搅拌20 min. 再把TsCl (2.52 g, 13.33 mmol)溶于THF (30 mL), 缓慢滴加入反应体系. 滴加完毕后继续搅拌12 h. 待反应结束, 用旋转蒸发器旋去体系内THF, 再加入DCM (50 mL). 依次用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤3次、饱和食盐水洗涤3次, 取有机相干燥、过滤. 经湿法上样硅胶柱提纯, 得无色透明黏稠液体S3 (3.56 g, 产率89%)。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7.89 ~ 7.78 (d, 2H; ArH), 7.43 ~ 7.33 (d, 2H; ArH), 4.26 ~ 4.15 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3.80 ~ 3.70 (q, 4H;

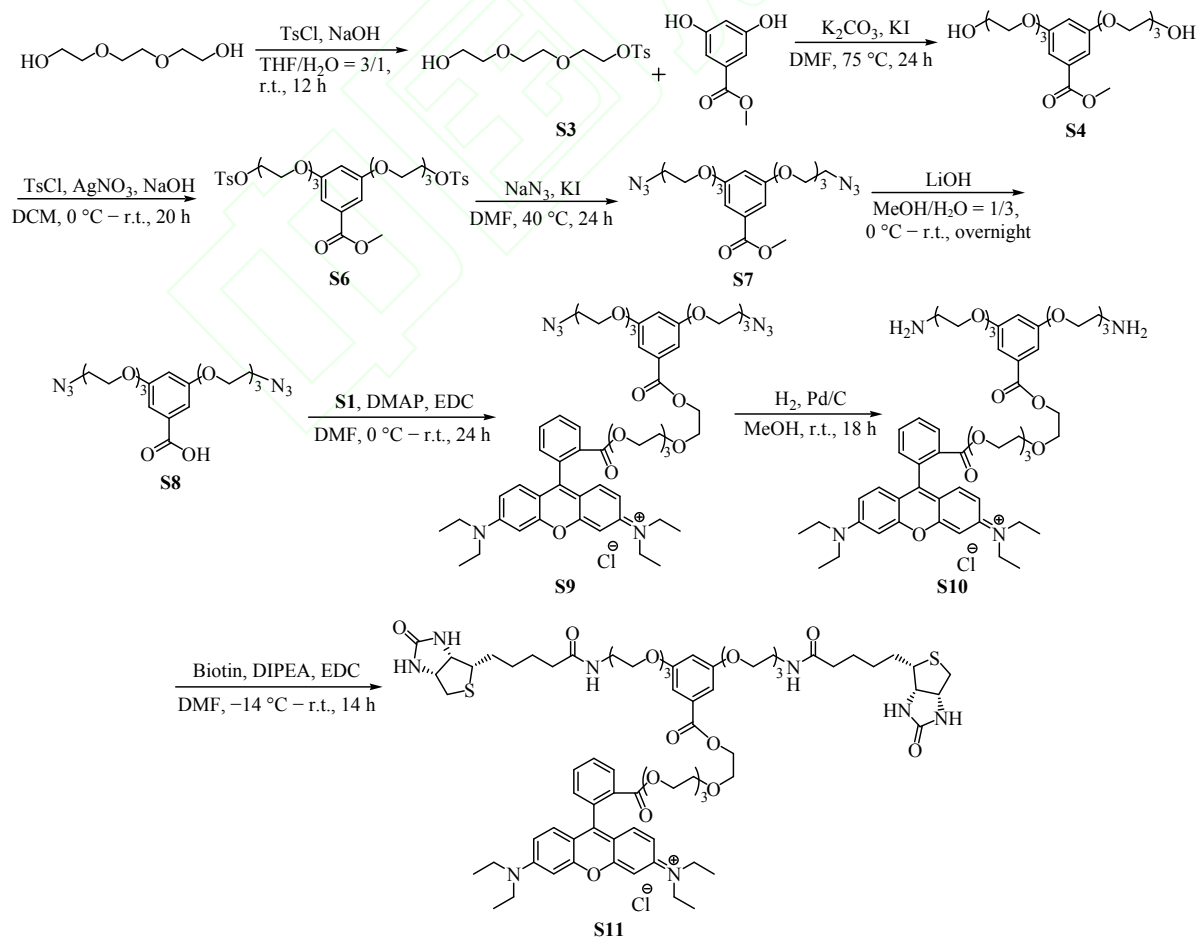


Fig. 2 Synthetic route to RhYBio<sub>2</sub>

CH<sub>2</sub>), 3.69 ~ 3.56 (m, 6H; CH<sub>2</sub>), 2.55 ~ 2.43 (s, 3H; CH<sub>3</sub>)(见附电子支持信息图S3).

#### 1.4.2 化合物S4的合成

将S3 (2.54 g, 8.31 mmol)、3,5-二羟基苯甲酸甲酯 (0.63 g, 3.74 mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.56 g, 11.23 mmol)和KI (0.30 g)置于圆底烧瓶中, N<sub>2</sub>置换3次并密闭体系. 在无氧条件下把DMF (80 mL)加入至体系中, 75 °C下搅拌24 h. 待反应完毕, 旋去DMF, 加入DCM (80 mL), 依次用去离子水洗涤3次、饱和食盐水洗涤3次. 取有机相干燥过滤, 抽干. 经干法上样硅胶柱分离, 得浅黄色透明黏稠液体S4 (1.40 g, 产率86%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7.23 ~ 7.16 (d, 2H; ArH), 6.77 ~ 6.69 (t, 1H; ArH), 4.20 ~ 4.10 (t, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.91 ~ 3.88 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 3.88 ~ 3.82 (m, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.76 ~ 3.67 (m, 12H; CH<sub>2</sub>), 3.64 ~ 3.59 (m, 4H; CH<sub>2</sub>)(见电子支持信息图S4).

#### 1.4.3 化合物S5的合成

分别制备AgNO<sub>3</sub> (3.27 g, 19.26 mmol, 20 mL)与NaOH (0.77 g, 19.26 mmol, 10 mL)水溶液, 并将NaOH水溶液逐滴加入AgNO<sub>3</sub>水溶液中, 搅拌5 min. 待反应完毕, 过滤得黑色固体, 并用去离子水洗涤3次. 最后将产物转移至真空干燥箱处理12 h. 最后得黑色固体粉末S5 (1.83 g, 产率82%).

#### 1.4.4 化合物S6的合成

将S4 (1.40 g, 3.24 mmol)和S5 (1.56 g, 6.73 mmol)置于反应瓶中, 加入DCM (50 mL)搅拌, 冰浴30 min. 再把TsCl (2.02 g, 12.96 mmol)溶于DCM (30 mL)并缓慢滴入至反应瓶中. 继续冰浴2 h, 逐渐升至室温后搅拌18 h. 待反应结束, 将体系过滤, 所得有机相依次用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤3次、饱和食盐水洗涤3次, 把有机相干燥、过滤和抽干. 最后得到浅黄色透明黏稠液体S6 (2.10 g, 产率88%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7.83 ~ .56 (d, 4H; ArH), 7.36 ~ 7.39 (d, 4H; ArH), 7.21 ~ 7.16 (d, 2H; ArH), 6.72 ~ 6.65 (t, 1H; ArH), 4.19 ~ 4.14 (t, 4H; CH<sub>2</sub>), 4.14 ~ 4.10 (t, 3H; CH<sub>2</sub>), 3.91 3.86 (d, 3H; CH<sub>3</sub>), 3.84 ~ 3.79 (m, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.72 ~ 3.67 (t, 4H;

CH<sub>2</sub>), 3.67 ~ 3.58 (m, 8H; CH<sub>2</sub>), 2.46 ~ 2.41 (d, 6H; CH<sub>3</sub>)(见电子支持信息图S5).

#### 1.4.5 化合物S7的合成

将S6 (2.00 g, 2.70 mmol)、NaN<sub>3</sub> (0.42 g, 6.48 mmol)以及KI (0.20 g)加入至反应瓶中, N<sub>2</sub>置换3次. 在无氧条件下把DMF (80 mL)加入至反应瓶中, 40 °C下搅拌24 h. 待反应完成后, 把DMF旋干并加入DCM (80 mL), 依次用去离子水洗涤2次、饱和食盐水洗涤3次. 取有机相干燥, 过滤和旋干. 最后得浅黄色透明黏稠液体S7 (0.78 g, 产率62%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7.21 ~ 7.17 (d, 2H; ArH), 6.72 ~ 6.68 (d, 1H; ArH), 4.18 ~ 4.11 (t, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.90 ~ 3.88 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 3.88 ~ 3.83 (m, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.77 ~ 3.64 (m, 12H; CH<sub>2</sub>), 3.42 ~ 3.36 (t, 4H; CH<sub>2</sub>)(见电子支持信息图S6).

#### 1.4.6 化合物S8的合成

将LiOH·H<sub>2</sub>O (0.65 g, 15.54 mmol, 10 mL)水溶液与MT (15 mL)在茄形瓶内充分混合, 冰浴30 min. 再把S7 (0.75 g, 1.55 mmol)溶于MT (15 mL)并缓慢滴加入茄形瓶内, 搅拌反应过夜. 待反应完毕, 将体系内MT蒸除, 加入DCM (40 mL)并用KHSO<sub>4</sub> (10 wt%)水溶液把体系pH值调至3. 取萃取后的有机相干燥, 过滤并抽干, 得浅黄色透明黏稠液体S8 (0.64 g, 产率88%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7.26 ~ 7.23 (d, 2H; ArH), 6.77 ~ 6.72 (t, 1H; ArH), 4.20 ~ 4.12 (t, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.92 ~ 3.84 (t, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.78 ~ 3.73 (m, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.73 ~ 3.64 (m, 8H; CH<sub>2</sub>), 3.43 ~ 3.36 (t, 4H; CH<sub>2</sub>)(见电子支持信息图S7).

#### 1.4.7 化合物S9的合成

将S1 (0.84 g, 1.28 mmol)、S8 (0.60 g, 1.28 mmol)和DMAP (10 mg)置于圆底烧瓶中, N<sub>2</sub>置换3次. 在无氧条件下加入DMF (45 mL)搅拌溶解, 冰浴30 min. 再向体系中加入EDC·HCl (0.26 g, 1.28 mmol), 冰浴下搅拌2 h后逐渐升至室温再搅拌24 h. 待反应结束, 把DMF旋干, 加入DCM (50 mL), 依次用KHSO<sub>4</sub> (10 wt%)水溶液洗涤1次、饱和食盐水洗涤3次. 取DCM相干燥, 过滤抽干. 经湿法上样硅胶柱分离, 得紫色泡状固体

**S9** (0.65 g, 产率46%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 8.27 ~ 8.21 (dd, 1H; ArH), 7.95 ~ 7.79 (m, 2H; ArH), 7.53 ~ 7.44 (dd, 1H; ArH), 7.10 ~ 6.92 (m, 8H; ArH), 6.83 ~ 6.78 (t, 1H; ArH), 4.37 ~ 4.28 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 4.14 ~ 4.06 (m, 4H;  $\text{CH}_2$ ), 4.06 ~ 3.99 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3.78 ~ 3.68 (m, 6H;  $\text{CH}_2$ ), 3.67 ~ 3.51 (m, 21H;  $\text{CH}_2$ ), 3.49 ~ 3.43 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3.40 ~ 3.34 (t, 6H;  $\text{CH}_2$ ), 3.31 ~ 3.25 (m, 4H;  $\text{CH}_2$ ), 1.30 ~ 1.10 (t, 12H;  $\text{CH}_3$ ) (见电子支持信息图S8).

#### 1.4.8 化合物**S10**的合成

将**S9** (0.65 g, 0.59 mmol)置于反应瓶中, 加入MT (20 mL)搅拌溶解,  $\text{N}_2$ 置换3次. 再向体系中加入钯碳 (20 mg),  $\text{N}_2$ 置换3次. 将 $\text{H}_2$ 充入气球, 把 $\text{H}_2$ 气球与反应体系连接,  $\text{H}_2$ 置换3次, 密闭体系后室温下搅拌反应18 h. 待反应结束, 在无水无氧条件下将钯碳滤除, 把滤液所在体系与冷阱-油泵相连, 在无水无氧条件下将MT抽提至冷阱. MT抽提完毕后还需把体系中残余的MT用油泵彻底抽除. 最后得紫红色泡状固体**S10** (0.53 g, 产率85%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 7.80 ~ 7.72 (m, 1H; ArH), 7.68 ~ 7.60 (m, 1H; NH), 7.55 ~ 7.44 (m, 2H; ArH), 7.40 ~ 7.30 (m, 1H; NH), 7.26 ~ 7.16 (m, 1H; NH), 7.10 ~ 7.08 (m, 3H; ArH), 6.98 ~ 6.88 (m, 1H; NH), 6.86 ~ 6.70 (m, 2H; ArH), 4.37 ~ 4.28 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 4.14 ~ 4.06 (m, 4H;  $\text{CH}_2$ ), 4.06 ~ 3.99 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3.78 ~ 3.68 (m, 6H;  $\text{CH}_2$ ), 3.67 ~ 3.51 (m, 21H;  $\text{CH}_2$ ), 3.49 ~

3.43 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3.40 ~ 3.34 (t, 6H;  $\text{CH}_2$ ), 3.31 ~ 3.25 (m, 4H;  $\text{CH}_2$ ), 1.30 ~ 1.10 (t, 12H;  $\text{CH}_3$ ) (见电子支持信息图S9).

#### 1.4.9 化合物**S11**的合成

将**S10** (0.30 g, 0.28 mmol)、DIPEA (0.3 mL, 1.68 mmol)与生物素 (0.17 g, 0.68 mmol)置于茄形瓶中,  $\text{N}_2$ 置换3次. 无水无氧条件下加入DMF (30 mL)搅拌溶解, 冰盐浴 ( $-12\text{ }^\circ\text{C}$ ) 30 min. 再向体系中加入EDC·HCl (0.13 g, 0.68 mmol),  $\text{N}_2$ 置换2次; 冰盐浴下搅拌2 h后, 逐渐升至室温继续搅拌12 h. 待反应完成, 把体系内DMF蒸除并加入DCM (45 mL)溶解, 用 $\text{KHSO}_4$  (10 wt%)水溶液将体系pH值调至4, 洗涤后取DCM相干燥、过滤抽干. 经干法上样硅胶柱提纯, 得紫色泡状固体**S11**, 即配体RhYBio<sub>2</sub> (0.11 g, 产率26%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 7.80 ~ 7.85 (t, 1H; NH), 7.80 ~ 7.74 (m, 1H; ArH), 7.55 ~ 7.45 (m, 2H; ArH), 7.10 ~ 6.99 (m, 4H; ArH), 6.80 ~ 6.75 (m, 1H; NH), 6.45 ~ 6.25 (m, 8H; ArH), 4.39 ~ 4.33 (t, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 4.34 ~ 4.32 (m, 1H;  $\text{CH}_2$ ), 4.08 ~ 4.16 (m, 3H;  $\text{CH}_2$ ), 4.08 ~ 3.95 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3.77 ~ 3.70 (m, 4H;  $\text{CH}_2$ ), 3.67 ~ 3.61 (m, 3H;  $\text{CH}_2$ ), 3.61 ~ 3.55 (m, 4H;  $\text{CH}_2$ ), 3.43 ~ 3.55 (m, 10H; CH +  $\text{CH}_2$ ), 3.43 ~ 3.35 (m, 6H;  $\text{CH}_2$ ), 3.25 ~ 2.94 (m, 11H;  $\text{CH}_2$ ), 2.10 ~ 2.01 (t, 2H;  $\text{CH}_2$ ), 1.66 ~ 1.38 (m, 7H;  $\text{CH}_2$ ), 1.12 ~ 1.10 (t, 12H;  $\text{CH}_3$ ) (见电子支持信息图S10).

### 1.5 配体YBio<sub>2</sub>的合成与表征

我们还合成了不带罗丹明B的“Y”型配体

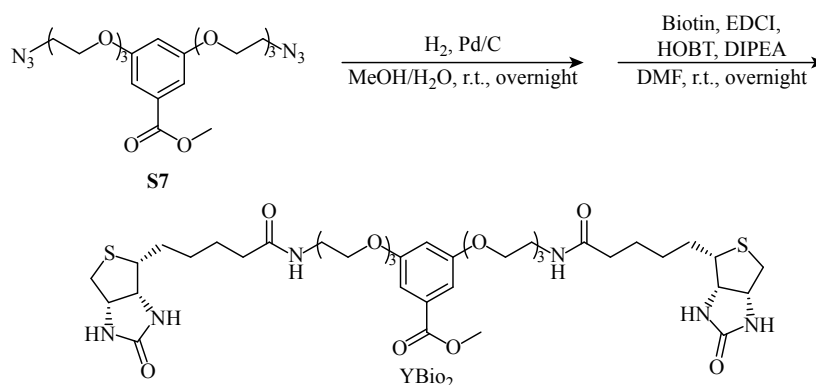


Fig. 3 Synthetic route to YBio<sub>2</sub>

YBio<sub>2</sub> (如图3中的化合物YBio<sub>2</sub>), 通过重复单元为烷氧基的柔性链将生物素与核连接起来. 合成路线如图3所示, 详细的合成方法如下.

将S7 (0.73 g, 1.51 mmol)置于干燥的24 mL的圆底烧瓶中, 加入Pd/C (50.00 mg), 并加入MeOH 15 mL, 置换3次H<sub>2</sub>, 并在H<sub>2</sub>条件室温搅拌过夜, 经TLC点板基本反应完全, 过滤掉Pd/C, 用旋转蒸发仪旋干MeOH. 加入Biotin (0.67 g, 2.73 mmol), EDCI (1.58 g, 8.27 mmol), HOBT (0.22 g, 1.65 mmol), 抽空换氩3次, 加入无水DMF 16 mL, 紧接着逐滴加入DIPEA (1.50 mL, 8.27 mmol), 氩气保护下室温搅拌过夜. 经TLC检测反应完全, 用旋转蒸发仪旋干DMF, 加入EA溶解反应液, 饱和NaCO<sub>3</sub>洗有机相3次, 再用EA反萃水相3次, 合并有机相并干燥浓缩. 经干法上样硅胶柱提纯 (*V*(EA):*V*(MeOH) = 10:1), 得到白色固体, 即配体YBio<sub>2</sub> (0.73 g, 产率50%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 7.06 (d, 2H; ArH), 6.81 (s, 1H; ArH), 4.33 ~ 4.25 (m, 2H; CH), 4.12 (dd, 9H; CH, CH<sub>2</sub>), 3.84 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 3.75 ~ 3.71 (m, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.59 (dd, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.55 ~ 3.51 (m, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.40 (t, 4H; CH<sub>2</sub>), 3.12 ~ 3.04 (m, 2H; CH<sub>2</sub>), 2.81 (dd, 2H; CH<sub>2</sub>), 2.57 (d, 3H; CH<sub>2</sub>), 2.05 (t, 4H; CH<sub>2</sub>), 1.58 (dd, 3H; CH<sub>2</sub>), 1.46 (td, 5H; CH<sub>2</sub>), 1.35 ~ 1.23 (m, 4H; CH<sub>2</sub>) (见电子支持信息图S11).

## 1.6 绿色荧光融合蛋白MBP-GFP-SA的原核表达与纯化

### 1.6.1 原核表达载体的构建

参考NCBI中已发表的相关序列信息<sup>[5]</sup>, 全基因合成了两端分别带有*Bam*H I和*Xho* I酶切位点的GFP-SA碱基序列, 通过对该目的片段和表达载体(pET28a-MBP)的双酶切处理, 并使用凝胶电泳纯化回收双酶切产物, 再利用T4连接酶连接

GFP-SA和pET28a-MBP. 将连接产物转化至DH5α感受态, 挑选单克隆经测序验证后获得pET28a-MBP-GFP-SA质粒(详见电子支持信息GFP-SA蛋白序列).

### 1.6.2 荧光融合蛋白GFP-SA的诱导表达与纯化

MBP-GFP-SA质粒经测序检验正确后, 转化至BL21 (DE3)感受态中, 过夜培养. 第2天挑取单克隆菌落加入到小试管中扩增, 并大规模诱导表达. 采用5 mL的Ni-NTA亲和层析柱进行纯化, 用含咪唑的缓冲溶液梯度竞争洗脱, 检测UV 280 nm吸光值并收集出峰位置的洗脱样品. 我们纯化的样品是带MBP以及多聚组氨酸标签的融合蛋白MBP-GFP-SA, 为了得到无标签的GFP-SA进行后续组装实验, 使用实验室纯化的PreScission酶处理已纯化好的MBP-GFP-SA, 切除MBP和His标签, 再将酶切后的产物反挂Ni-NTA层析柱最终得到无标签的荧光融合蛋白GFP-SA. 将收集的洗脱样品超滤浓缩, 上样至Superdex 75 Increase高分辨率凝胶过滤层析(分子筛)进一步纯化, 最终产物保存在50 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0的缓冲溶液中.

### 1.6.3 荧光融合蛋白GFP-SA性质的鉴定

通过SDS-PAGE电泳, 验证每一步收集的纯化蛋白质, 并计算产率产量, 之后将纯化后的GFP-SA通过基质辅助激光解吸电离-串联质谱仪(MALDI-TOF)确定其精确分子量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光融合蛋白GFP-SA的表达、纯化与鉴定

使用原核表达方法表达含MBP标签的重组荧光融合蛋白质GFP-SA. 通过此方法, 经过Ni-NTA亲和层析柱初步纯化后, 可以从1 L大肠杆菌培养液中得到重组融合蛋白GFP-SA约31.5 mg, 其纯度达98%以上(详见表1).

利用Ni-NTA初步纯化MBP-GFP-SA后,

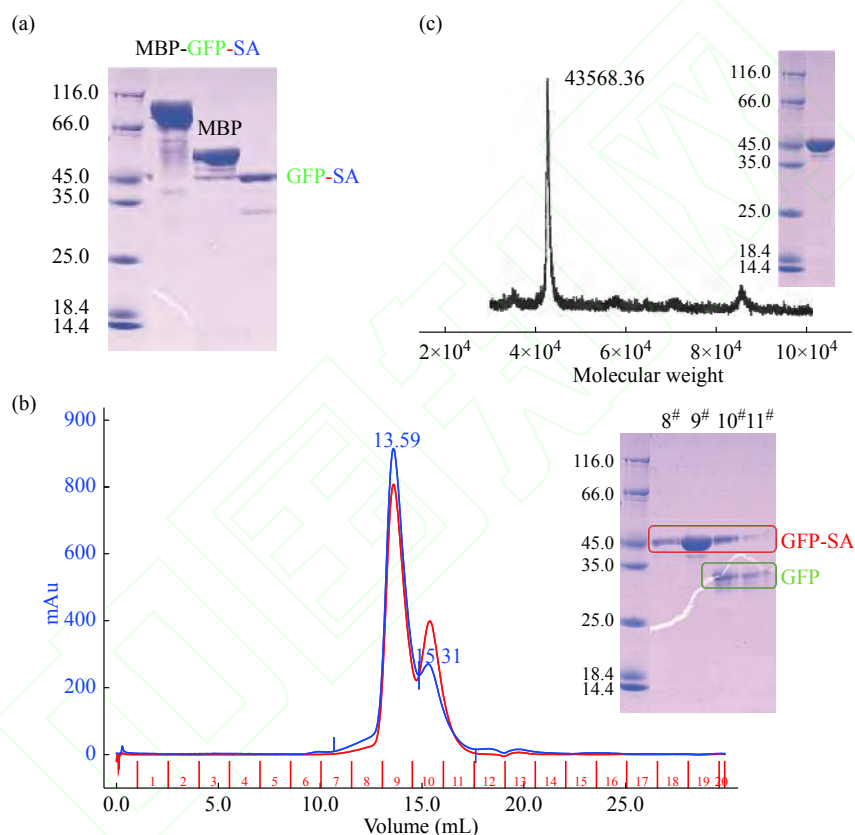
Table 1 Purification of recombinant GFP-SA from 1 L *E. coli* cells

Item	Total protein (mg)	Purity (%)	Volume (mL)	Concentration (mg/mL)	Yield (mg)	Recovery rate (%)	
MBP-GFP-SA	Supernatant	5856	1.2	60	97.6	70.2	100
	Ni-NTA	68	91.2	20	3.4	62.0	88.3
GFP-SA	2 <sup>nd</sup> Ni-NTA	40	93.5	16	2.5	37.6	53.6
	Superdex 75	32	98.5	20	1.6	31.5	44.9

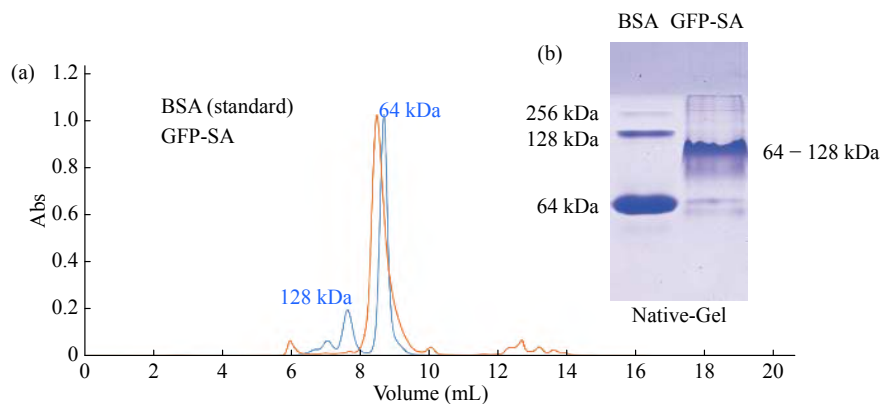
SDS-PAGE电泳结果显示其分子量约95 kDa (如图4(a)), 与理论分子量大小相符, 再通过切除MBP标签并二次Ni-NTA反挂得到无标签的目的融合蛋白GFP-SA (如图4(a)); 将GFP-SA富集(初纯化的蛋白纯度可以达90%以上), 使用高分辨率凝胶过滤层析(分子筛)对Ni-NTA柱粗纯化产物进行处理, 结果如图4(b)所示: 融合蛋白GFP-SA以单峰状态存在(13.59 mL的出峰位置), 在分子量较小的15.31 mL位置的凸起为GFP. 进一步通过

SDS-PAGE电泳(如图4(b))和MALDI-TOF质谱验证了蛋白质GFP-SA的分子量在43 kDa左右, 与理论分子量相符(如图4(c)).

我们随后使用凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)以及非变性聚丙烯酰胺(native-PAGE)凝胶电泳来验证GFP-SA在溶液中的聚集状态. 使用牛血清白蛋白(BSA)作为GPC实验的标准样品, 测得目的蛋白GFP-SA的分子量大小在64 ~ 128 kDa之间(如图5(a)). 同样, 非变性



**Fig. 4** (a) Verification of the expression and Ni-NTA purification of GFP-SA by SDS-PAGE; (b) Purification of GFP-SA by Superdex 75 size exclusive chromatography and SDS-PAGE; (c) Verification of the molecular weight of GFP-SA by MALDI-TOF



**Fig. 5** (a) Verification of the oligomeric state of GFP-SA by GPC and (b) native PAGE gel

胶电泳实验也得到了类似结果,如图5(b)所示. 因为GFP-SA融合蛋白的单体分子量大小为43 kDa, 因此融合蛋白GFP-SA在溶液中以二聚体形式存在.

## 2.2 融合蛋白GFP-SA与RhYBio<sub>2</sub>的自组装及表征

利用等温滴定量热仪(ITC 200)对融合蛋白GFP-SA与生物素的结合能力进行测试, 用生物素(1 mmol/L)滴定融合蛋白GFP-SA (0.1 mmol/L), 结果为该蛋白质具有2个生物素结合位点, 结合常数为 $4.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (如图6). 该数值与文献报道的SA突变体与生物素的结合能力相吻合<sup>[22, 23]</sup>.

室温下, 向GFP-SA溶液中(100  $\mu\text{L}$ , 0.1 mmol/L), 加入RhYBio<sub>2</sub> (10  $\mu\text{L}$ , 1 mmol/L), 快速充分混合均匀, 并利用光散射技术对其粒径进行表征分析(如图7). 我们同时也进行了SA对照组实验. 当对照蛋白质SA与RhYBio<sub>2</sub>混合后并没有粒径上的明显变化, 24 h之后才有几十纳米的变化, 并通过TEM观察到一些无规则的线状聚集体(见电子支持信息图S12); 而当融合蛋白GFP-SA与RhYBio<sub>2</sub>混合后粒径明显快速地增长, 如图7(a)所示. 混合1 min后粒径便会快速增加至376 nm, 随后以几分钟为间隔的连续测试表明, 2 h后该混

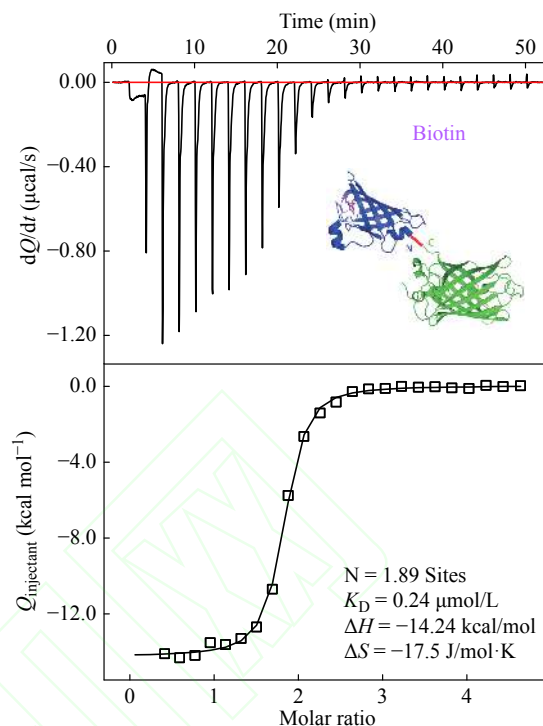


Fig. 6 ITC results of Biotin (1 mmol/L) binding with GFP-SA (0.1 mmol/L)

合液的粒径不再有明显变化, 保持在1300 nm左右(图7(b)).

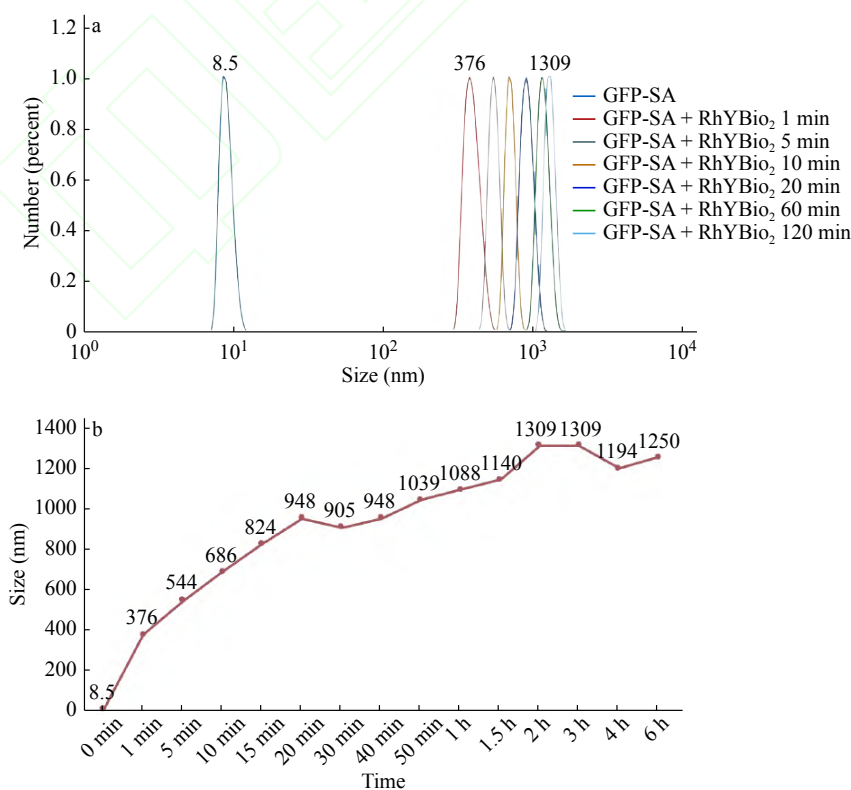


Fig. 7 DLS results of (a) GFP-SA + RhYBio<sub>2</sub> solution and (b) time tracking of DLS results from 0 min to 6 h (The online version is colorful.)



随后, 利用透射电子显微镜(TEM)对配体 RhYBio<sub>2</sub>与融合蛋白GFP-SA的组装体形貌进行表征, 发现其为微米级的环状组装体, 该环宽度较为均一, 约为30 nm (如图8(a)). 为了排除TEM制样过程对组装体形貌产生的影响, 还通过激光共聚焦显微镜(confocal microscope)对溶液中的组装体进行表征, 同样发现了荧光微米环, 并且分别在488 nm (GFP的激发波长)和561 nm (罗丹明B的激发波长)激光器下稳定发光(如图8(b)). 这说明了该微米环是由融合蛋白GFP-SA和配体RhYBio<sub>2</sub>共同组装而成, 是基于GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub>复合物的环状组装体.

### 2.3 不同配体与融合蛋白GFP-SA组装的控制实验

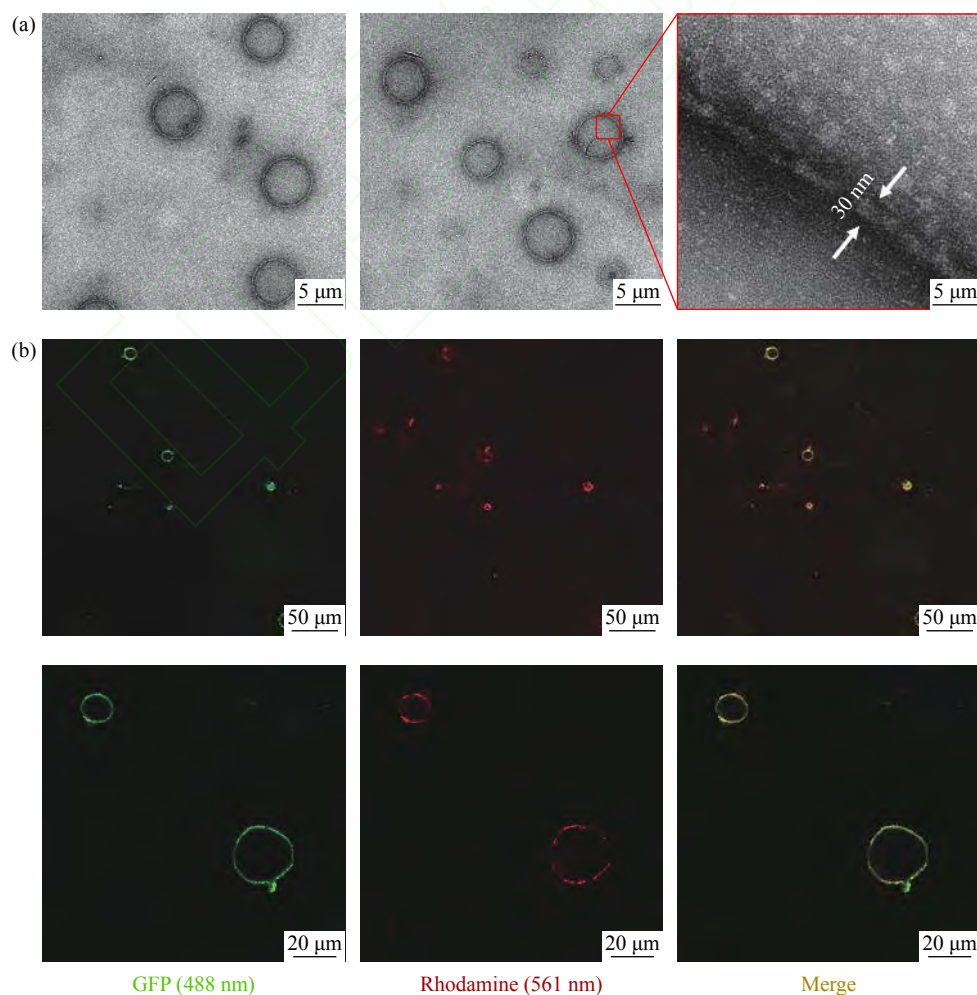
为了研究GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub>复合物组装成环的机理, 我们还合成了其他配体分子Rh4Bio和YBio<sub>2</sub>来进行控制实验, 其中Rh4Bio仅有1个生物

素分子和1个罗丹明B分子, 而YBio<sub>2</sub>则带有2个生物素分子而没有罗丹明B. 用配体 Rh4Bio和YBio<sub>2</sub>分别与GFP-SA进行组装实验(图9(a)), 从动态光散射(DLS)结果来看, 粒径尺寸几乎没有变化, 如图9(b)所示.

### 2.4 讨论

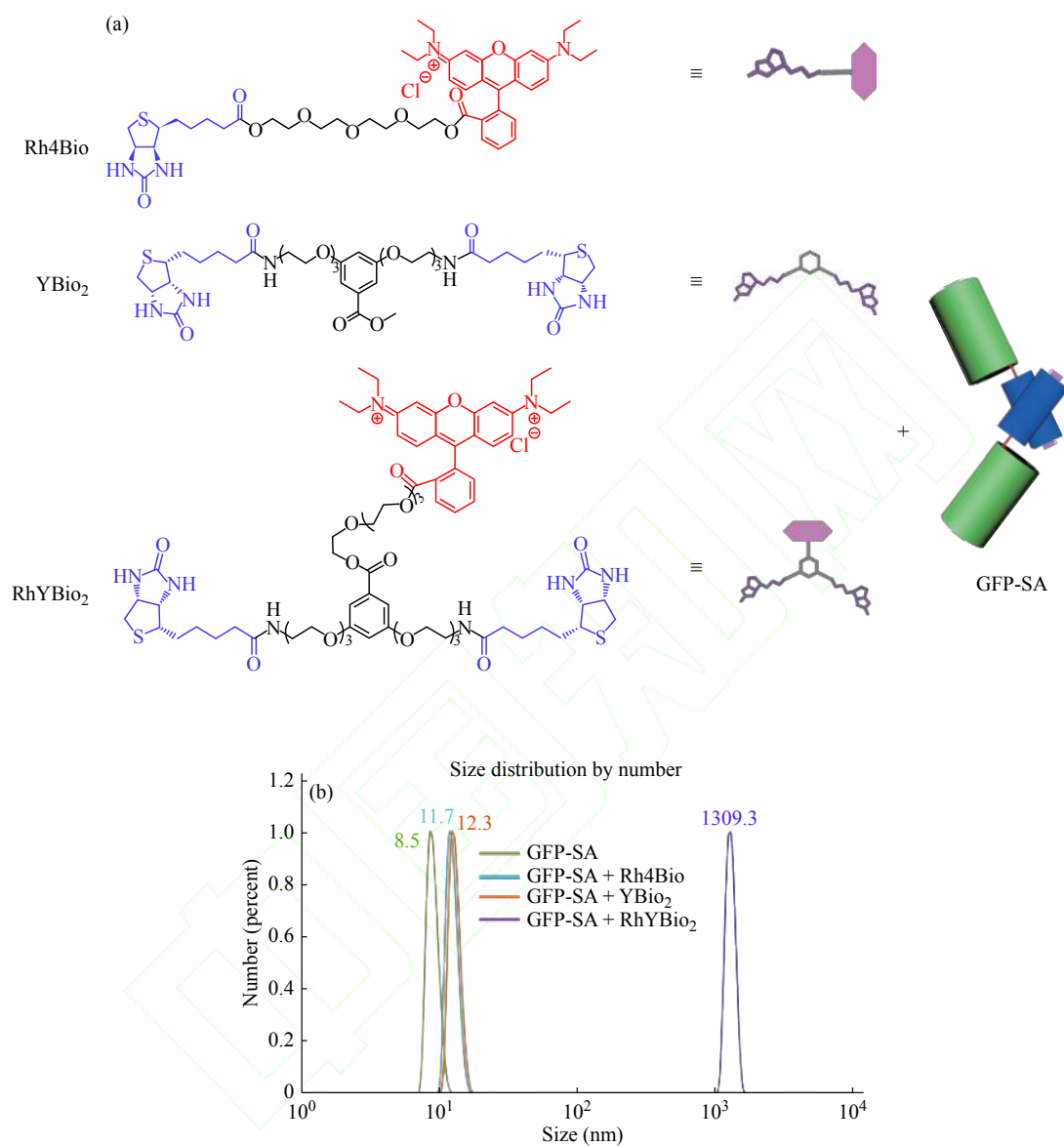
野生型链酶亲和素为四聚体蛋白, 为了更好地控制本组装体系, 我们选择的链酶亲和素是可二聚化的链酶亲和素突变体SA (PDB code: 4EKV, 详见电子支持信息中融合蛋白质序列), 其在溶液中以二聚体形式存在. 在文中2.1节中已表征出融合蛋白GFP-SA也是二聚体(如图4和5). 根据SA的二聚形态(如图10(a)), 我们推断出融合蛋白GFP-SA是以SA二聚为中心的一个融合二聚体蛋白(如图10(b)).

通过对环状组装体的宽度与融合蛋白GFP-

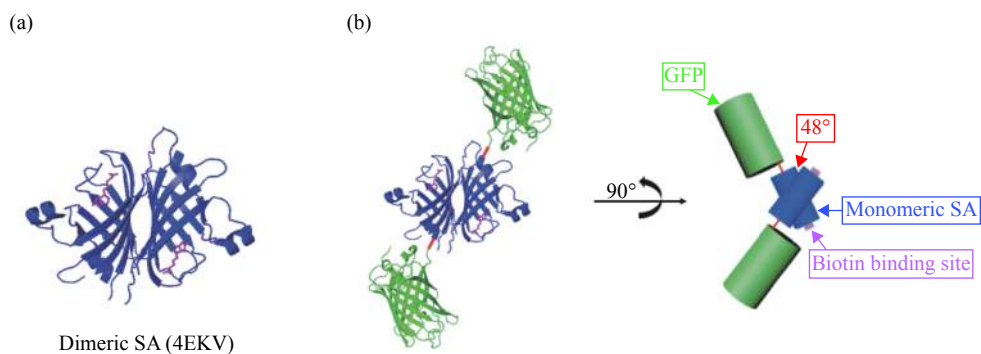


**Fig. 8** (a) Representative TEM images of micro-rings formed by GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub> and the measurement of the width of micro-rings; (b) Confocal images of micro-rings formed by GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub>

SA尺寸的比较(图11(a)), 我们推测当融合蛋白质 GFP-SA中加入配体RhYBio<sub>2</sub>后, 配体中的2个生 物素分子分别与不同的GFP-SA进行特异性结 合, 可将2个二聚化融合蛋白GFP-SA以“肩并肩”



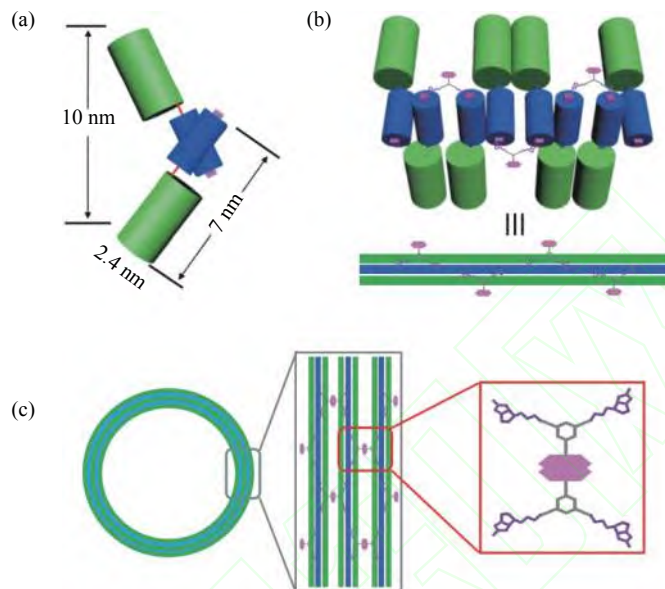
**Fig. 9** (a) Chemical structures and cartoons of three ligands Rh4Bio, YBio<sub>2</sub> and RhYBio<sub>2</sub> mixed with GFP-SA; (b) DLS results of blank GFP-SA, GFP-SA/Rh4Bio, GFP-SA/YBio<sub>2</sub> and GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub> (The online version is colorful.)



**Fig. 10** (a) Cartoon of dimeric SA presented by PYMOL (PDB code: 4EKV); (b) Dimeric GFP-SA presented by PYMOL and 3D-MAX

形态排列, 并形成纳米线状结构(图11(b)). 该纳米线再通过配体中的罗丹明B二聚化进行更高级的组装(图11(c)), 形成蛋白质微米环. 由于融合蛋白GFP和SA之间连接多肽链具有一定的柔性, 以

及GFP的桶状结构相比于SA的桶状结构较大, 导致蛋白质纳米线在进一步组装过程中产生曲率变化, 从而形成微米环. 遗憾的是, 我们目前尚不能控制微米环直径尺寸分布.



**Fig. 11** (a) Comparison of the size in TEM images and in GFP-SA cartoon; (b) Molecular arrangement mode; (c) Further assemblies of micro-ring

### 3 结论

在本研究中, 我们利用配体分子所参与的双重非共价作用, 即链酶亲和素(SA)与生物素的特异性结合, 配体RhYBio<sub>2</sub>中罗丹明B的二聚化; 以及蛋白质与蛋白质之间的相互作用, 即二聚体融合蛋白GFP-SA, 共同实现了融合蛋白质GFP-SA与配体RhYBio<sub>2</sub>的自组装. 我们所制备的GFP-

SA/RhYBio<sub>2</sub>自组装体, 最终形成了蛋白质微米环, 其形貌规整, 并具有较强的荧光. 蛋白质是一种来源丰富、具有良好生物相容性的可再生资源. 在本研究中, 我们利用重组融合蛋白质, 构建了形貌较为规整的蛋白质微米环组装体, 未来可通过重组蛋白质的多样性来构建具有生物活性、环境友好型的生物材料. 该类材料有望在荧光定位, 药物载送方面展现出较好的应用前景.

### REFERENCES

- 1 Sinclair J C, Davies K M, Venien-Bryan C, Noble M E M. *Nat Nanotechnol*, 2011, 9: 558 – 562
- 2 Ringler P, Schulz G E. *Science*, 2003, 5642: 106 – 109
- 3 Padilla J E, Colovos C, Yeates T O. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 5: 2217 – 2221
- 4 Lai Y T, King N P, Yeates T O. *Trends Cell Biol*, 2012, 12: 653 – 661
- 5 Bai Y, Luo Q, Liu J. *Chem Soc Rev*, 2016, 10: 2756 – 2767
- 6 Lin Mingchang (林铭昌), Chen Guosong (陈国颂). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2017, (7): 1114 – 1120
- 7 Meng Jianqiang (孟建强), Dong Yongquan (董永全), Li Zichen (李子臣). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2010, (5): 550 – 555
- 8 Oohora K, Burazerovic S, Onoda A, Wilson Y M, Ward T R, Hayashi T. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 16: 3818 – 3821
- 9 Kostianen M A, Kasyutich O, Cornelissen J J, Nolte R J. *Nat Chem*, 2010, 5: 394 – 399
- 10 Kostianen M A, Hiekkataipale P, Laiho A, Lemieux V, Seitsonen J, Ruokolainen J, Ceci P. *Nat Nanotechnol*, 2013, 1: 52 – 56
- 11 Miao L, Han J, Zhang H, Zhao L, Si C, Zhang X, Hou C, Luo Q, Xu J, Liu J. *ACS Nano*, 2014, 4: 3743 – 3751

- 12 Salgado E N, Radford R J, Tezcan F A. *Acc Chem Res*, 2010, 5: 661 – 672
- 13 Brodin J D, Ambroggio X I, Tang C, Parent K N, Baker T S, Tezcan F A. *Nat Chem*, 2012, 5: 375 – 382
- 14 Biswas S, Kinbara K, Oya N, Ishii N, Taguchi H, Aida T. *J Am Chem Soc*, 2009, 22: 7556 – 7557
- 15 Bai Y, Luo Q, Zhang W, Miao L, Xu J, Li H, Liu J. *J Am Chem Soc*, 2013, 30: 10966 – 10969
- 16 Sakai F, Yang G, Weiss M S, Liu Y, Chen G, Jiang M. *Nat Commun*, 2014: 4634
- 17 Yang G, Zhang X, Kochovski Z, Zhang Y F, Dai B, Sakai F J, Jiang L, Lu Y, Ballauff M, Li X M, Liu C, Chen G S, Jiang M. *J Am Chem Soc*, 2016, 6: 1932 – 1937
- 18 Yang G, Ding H M, Kochovski Z, Hu R T, Lu Y, Ma Y Q, Chen G S, Jiang M. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 36: 10691 – 10695
- 19 Yang G, Hu R T, Ding H M, Kochovski Z, Mei S L, Lu Y, Ma Y Q, Chen G S, Jiang M. *Mat Chem Front*, 2018, 9: 1642 – 1646
- 20 Qi W J, Zhang Y F, Kochovski Z, Wang J, Lu Y, Chen G S, Jiang M. *Nano Res*, 2018, 10: 5566 – 5572
- 21 Xu M, Liu L, Yan Q. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 18: 5029 – 5032
- 22 O'Sullivan V J, Barrette-Ng I, Hommema E, Hermanson G T, Schofield M, Wu S C, Honetschlaeger C, Ng K K S, Wong S L. *Plos One*, 2012, 4: e35203
- 23 Qureshi M H, Yeung J C, Wu S C, Wong S L. *J Biol Chem*, 2001, 49: 46422 – 46428

## Micro Rings Self-assembled by Fluorescent Fusion-protein Based on Multiple Non-covalent Interactions

Rongting Hu<sup>1</sup>, Jue Wang<sup>1</sup>, Jing Yang<sup>1</sup>, Yu Ding<sup>2\*</sup>, Guosong Chen<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>*Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200438*)

(<sup>2</sup>*Department of Physiology and Biophysics, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438*)

**Abstract** Proteins are attractive building blocks for construction of variant functional materials because of their chemical and structural diversities, and intrinsic functions. As the industry of biotechnology continues to expand, so does the expression of recombinant proteins with wide varieties. In this work, we adopted the recombinant protein technique to construct a new fusion protein, GFP-SA, as the building block of self-assemblies. The purification of GFP-SA was characterized by Superdex 75 size exclusive chromatography, SDS-PAGE, and MALDI-TOF. Then, GPC and native-PAGE were used to characterize the dimerization of GFP-SA based on the hydrogen bonds between neighboring SAs. Furthermore, ITC was employed to test the binding ability between GFP-SA and biotin, which revealed  $K_D = 0.24 \mu\text{mol/L}$ . In this study, we also designed and successfully synthesized the ligand RhYBio<sub>2</sub>, which is composed of two biotin molecules and one rhodamine B molecule. The size of GFP-SA increased rapidly to 370 nm within one minute after mixing with RhYBio<sub>2</sub>. We measured the particle size of GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub> mixture every few minutes until the size stabilized at around 1300 nm 2 h later. However, size variation was barely observed for the controlled samples of SA/RhYBio<sub>2</sub> (controlled protein) and GFP-SA/YBio (controlled ligand). We hypothesized that the two biotin molecules of RhYBio<sub>2</sub> could bind specifically with SA and align GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub> into nanowires, which assembled further into micro rings. Their size was measured by dynamic light scattering (DLS) while the morphology was observed intuitively on a transmission electron microscope (TEM) and a confocal microscope (CM). The characteristic results from TEM and CM suggested an uneven size distribution of the micro rings prepared, which might be attributable to the flexibility of the fusion protein GFP-SA. These micro rings of GFP-SA/RhYBio<sub>2</sub> with fluorescence has great potential for biological applications.

**Keywords** Fusion protein, GFP, Self-assembly, Micro rings

\* Corresponding authors: Yu Ding, E-mail: yuding@fudan.edu.cn

Guosong Chen, E-mail: guosong@fudan.edu.cn