

生物蛋白大环自组装及其功能化研究进展

徐强强, 龚翰林, 尚 洁, 潘铁铮, 葛 岩*, 戚震辉*

(陕西省柔性电子与健康科学国际联合研究中心, 中德空间生物材料与技术转化联合实验室,
西北工业大学生命学院, 西安 710072)

摘要:主要介绍了生物蛋白大环自组装及其功能化研究的新进展, 针对目前开发较为深入的蛋白大环结构特点、制备方法及其功能化探索等方面进行分析和评述。蛋白大环作为一类生物源高分子环状结构, 其研究是高分子化学、大环化学的延伸与拓展。蛋白质大环结构为功能性高分子的构筑提供了全新的材料设计与研究思路。随着蛋白自组装行为的动力学和热力学机制得到更为深入的解析, 操控蛋白自组装过程将变得更为娴熟。

关键词:蛋白大环; 生物高分子; 大环化学; 自组装

引言

近年来, 高分子化学家开始致力开发各种生物大分子自组装及功能化^[1~3]。蛋白大环作为一类生物源高分子环状结构, 其研究是高分子化学、大环化学的重要延伸。一直以来, 大环化合物颇受高分子化学家的青睐^[4]。早期大环研究多集中于冠醚、穴醚和球醚等有机大环的研究, 以此揭示了一系列超分子化学的重要基本概念。1987 年, Pedersen、Cram 以及 Lehn 也因此被授予了诺贝尔化学奖。之后, 第二代和第三代大环主体, 环糊精和杯芳烃相继被合成。1992 年, Harada 等成功合成了聚乙二醇与环糊精的聚轮烷^[5], 开拓了大环主体和高分子化学的交叉研究。2000 年之后, 葫芦脲大环结构诞生^[6]。此后 10 年, 越来越多新颖的有机大环主体被报道, 如柱芳烃^[7]、杯杂芳环^[8]、联苯芳烃^[9]、基于三叠烯的大环^[10]、基于四苯乙烯的大环^[11]、基于咪唑的大环^[12]、Cyanostar^[13]、动态共价大环^[14]等等, 其中很多具有非常独特的性质。2016 年, Sauvage、Stoddart 等因为分子机器的研究而被授予诺贝尔化学奖, 而有机大环正是分子机器的重要构筑基元。我国学者在有机大环领域也开展了一系列前沿工作, 探索了其在气体吸附^[15]、离子通道^[16]、两亲性自组装^[17]、药物投递^[18]、超分子聚合物^[19]、自修复材料^[20]等方面的应用。愈来愈多的有关有机大环合成与功能的报道, 充分反映了学术界对新型大环构筑单元研究的巨大兴趣。

蛋白大环是大环化学从有机到生物、由简单到复杂的自然进化^[21]。蛋白大环打破了有机大环直径的合成局限, 大环原子数呈指数级增长, 其环大小、官能团分布、客体种类呈现更为丰富的可能性(见图 1)。随着现代表征技术, 如 X-射线晶体衍射、原子力显微镜、冷冻透射显微镜等的进步, 各种蛋白晶体结构相继被成功解析, 使得人们精确掌握蛋白结构特性、选择适当蛋白的构筑方式成为可能^[22]。人们利用共价(如 Zero-length 交联、双键加成反应、巯基间形成二硫键的方法等)与非共价方法(如金属螯合、主客体相互作用、静电作用等), 深入研究蛋白大环的自组装行为, 并基于此来模拟生物体功能和制备各类生物高分子功能材料^[23]。蛋白质清晰可辨的结构、专一的识别能力、对靶向分子的特殊反应能力(抗体抗原结合、药物动力学等)又使蛋白大环在组织工程、生物矿化、纳米反应器、光捕获、药物释放系统等领域呈现出明显的优势^[24]。再者, 蛋白质来源于生物体本身, 有着先天的生物兼容性^[25]。因此, 蛋白大环自

10.14028/j.cnki.1003-3726.2019.10.013

收稿: 2019-05-28; 修回: 2019-07-05;

基金项目: 陕西省重点研发计划(2019KW-031, 2019KW-038);

作者简介: 徐强强(1995-), 男, 博士研究生。E-mail: 1812715726@qq.com;

* 通讯联系人: 葛岩(1982-), 女, 副教授。E-mail: ge@nwpu.edu.cn; 戚震辉(1983-), 男, 教授。E-mail: qi@nwpu.edu.cn.

组装及其功能化的研究正逐渐成为高分子化学、超分子化学、生物医学工程领域的新的学术前沿。

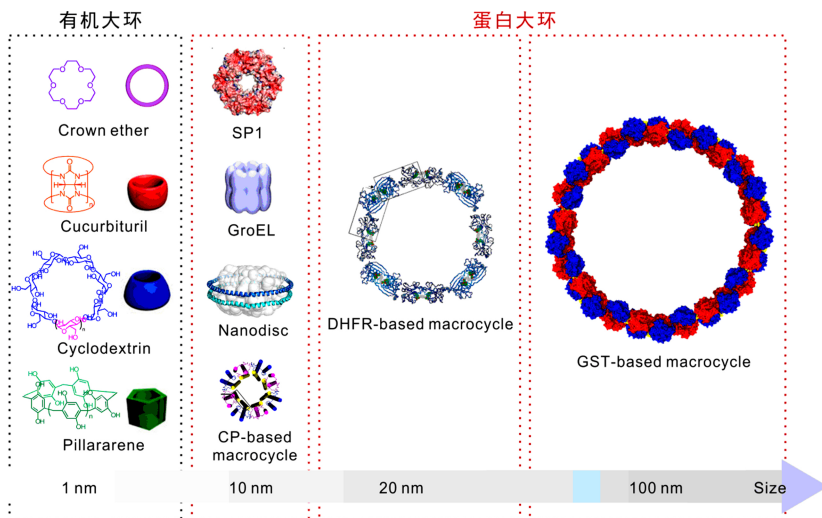


图 1 各类有机大环和生物大环体系

Figure 1 Organic synthesized macrocycles and diverse protein-based macrocycles

目前已有一些关于蛋白自组装的详细综述^[1, 26~28]。本文主要集中综述蛋白大环的自组装及其功能化方面的研究进展,对目前开发较为深入的蛋白大环的结构特点、制备方法及其功能化探索等方面进行分析和评述。

1 蛋白大环自组装及功能化

1.1 10nm 级直径的蛋白大环:SP1 体系

Stable Protein One(SP1)是一种天然环状蛋白,直径约为 11nm,中心孔径达 2.5nm,环高 4.5nm(见图 2a)。SP1 采取中心对称的由疏水相互作用和双重氢键作用形成的上下双层十二聚纳米环的形式,在水溶液中稳定存在。SP1 不仅具有比有机大环更大的环直径,同时还具有惊人的物理化学稳定性。SP1 的溶解温度可达到 107℃,是罕见的耐高温蛋白,同时它可抵御表面活性剂和某些蛋白酶,可稳定存在于有机溶剂中。如此稳定的化学结构特性使 SP1 成为理想的生物高分子材料。

近年,吉林大学刘俊秋课题组围绕 SP1 开展系统性研究并取得了丰硕的原创成果(见图 2)^[29]。首先,在围绕如何精确构筑一维(1D)蛋白纳米管和二维(2D)蛋白质结构这一问题上,刘俊秋等利用计算机辅助,成功提出共价偶联与超分子自组装两种有效策略。图 2a 展示了其中一种光刺激的共价偶联构筑路径。该设计利用计算机手段,发现只要将 84 处或 98 处位点的丝氨酸突变成酪氨酸并引入至 SP1,即可有效控制蛋白偶联方向。通过基因工程方法,将 SP1A84Y 突变引入在环形表面,而 SP1S98Y 突变则沿着环形侧面有序分布。当两者分别在白光照射下,SP1 便分别高效偶联形成 1D 纳米管和 2D 纳米结构^[30]。图 2b-d 则展示了他们提出的超分子自组装构筑路径。通过利用 SP1 独特的环表面带负电的性质,通过引入空间尺寸匹配、且静电互补的正电结构基元,如小分子乙二胺^[31]、带正点的纳米量子点(QD,见图 2c)^[32]、树枝状分子(dendrimer,见图 2d)^[33]、交联的胶束(micelle)^[34]等,均可诱导 SP1 在静电力驱动下组装成蛋白 1D 纳米线(见图 2b)。

他们还利用缺陷型表达将硒代半胱氨酸催化中心构建至 SP1 中,使其成为具有优异抗氧化活性的谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)模拟物,并将其与表面修饰 SOD 催化中心-锰卟啉的树枝状分子 PD5 共组装,不仅形成了 SP1-PD5 蛋白 1D 纳米线,而且还发现这是一个活性可与天然兔肝 GPx 和 Cu-Zn SOD 相媲美的高 GPx 活性、高 SOD 活性双酶协同抗氧化体系(见图 2b)^[35]。

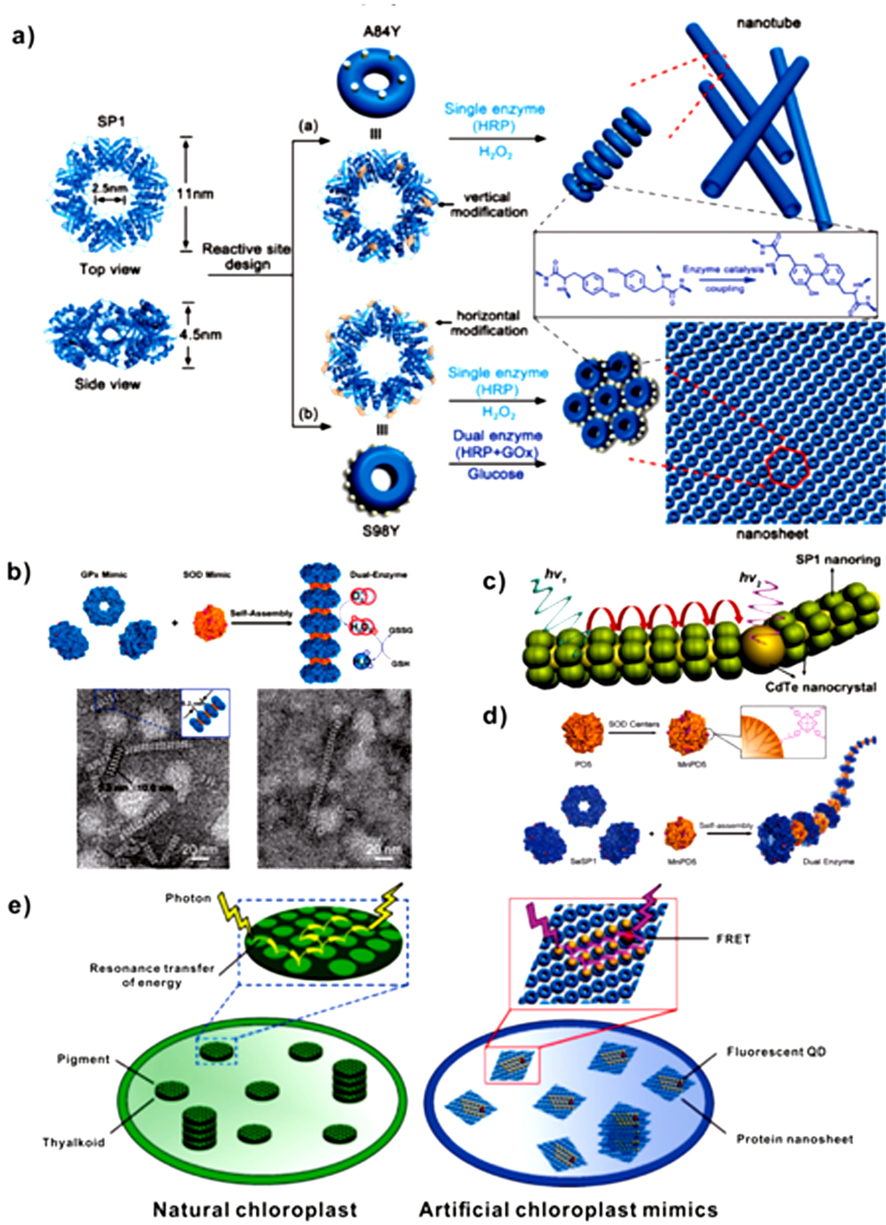


图 2 (a)SP1 蛋白大环构筑成的 1D 纳米管和 2D 纳米片,(b)SP1 制备 GPx-SOD 双酶协同体系, (c)、(d)量子点和树状大分子介导的 SP1 纳米线,(e)模拟叶绿体

Figure 2 (a) SP1 protein-macrocycle fabricated 1D nanotubes and 2D nanosheets, (b) enzyme mimic, (c, d) QD and dendrimer-induced SP1 nanowire, (e) simulated chloroplasts

在此基础上,他们还利用 SP1 蛋白大环可与 QD 客体复合的特性,将具有光学和电子特性的 QD 嵌入到 2D 蛋白纳米材料中,成功地开发出了一种人工光捕获系统(见图 2d)^[30, 36]。因 QD 可以像叶绿素一样发生明显的 FRET 现象,结构上类似于天然类囊体,继而使其可发挥叶绿体模拟物的功能。显然,这一纳米仿生体系的构筑联合了计算机模拟、生物技术与化学方法,实现了多学科之间的交叉,为多元化高分子蛋白仿生材料的构筑提供了新的思路。

1.2 10nm 级直径的蛋白大环:GroEL 体系

GroEL 蛋白是另一类极具吸引力的蛋白大环。GroEL 蛋白由 549 个氨基酸残基所组成,采取由二个以七个亚基组成的环叠加在一起形成的十四聚体双环桶状结构,它是可溶性蛋白,单体分子量为

60kDa 左右。从尺寸上来说,GroEL 的中心孔径约 4.5nm,比 SP1 略大,环高度达 14.6nm(见图 3a),对应于有机大环中的葫芦脲结构(见图 1)。GroEL 是一类重要的蛋白分子机器,是目前研究最为深入的分子伴侣之一,可帮助蛋白质正确折叠。在 ATP 刺激下,GroEL 环口可发生构象改变,能主动调节蛋白质错误折叠中间体的构象,以促进错误折叠的中间体复性。日本东京大学的 Aida 研究组正是利用 GroEL 蛋白的一系列特性开展了蛋白大环自组装及功能化研究(见图 3a)^[37]。

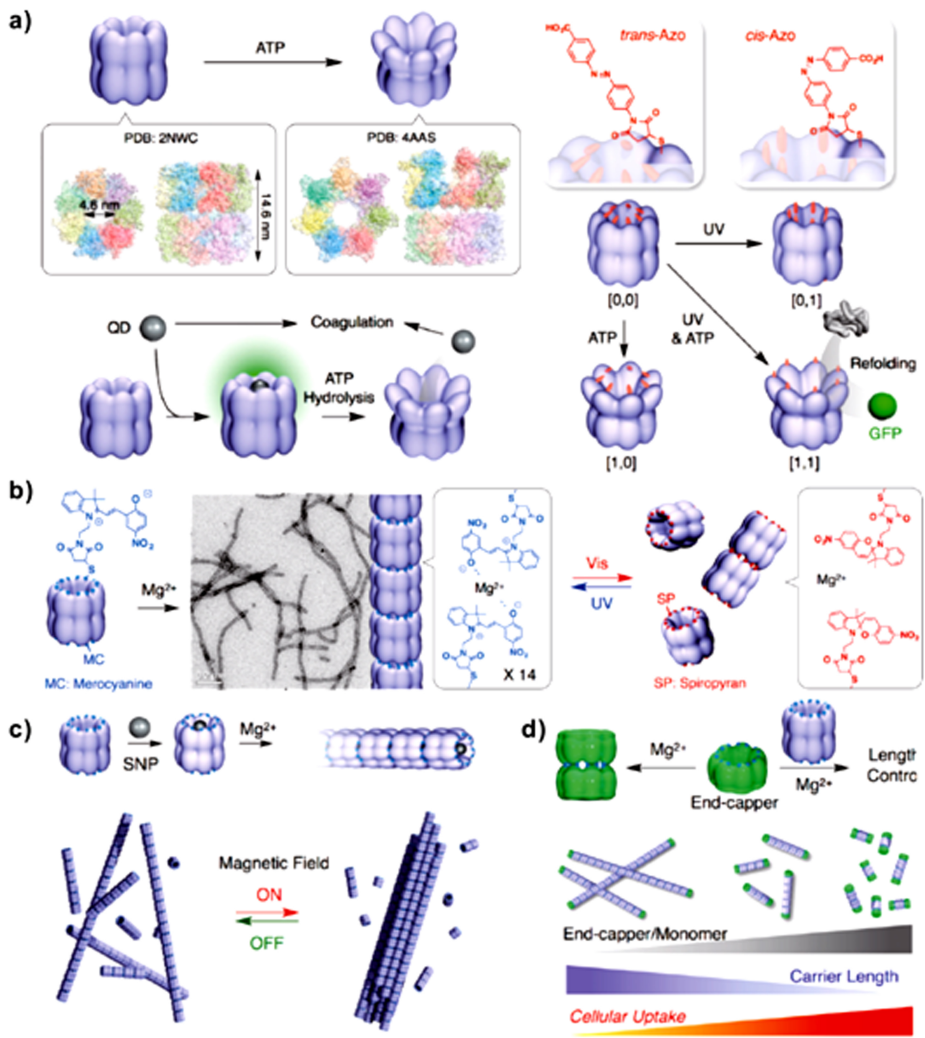


图 3 (a)分子伴侣 GroEL 蛋白的分子工程,(b)螺吡喃修饰的光控 GroEL 蛋白纳米管,(c)受磁场操控的 GroEL 结构,(d)调节 GroEL 蛋白纳米管长度及细胞内吞

Figure 3 (a) Molecular engineering of chaperonin GroEL, (b) merocyanine-modified GroEL mutant, (c) magnetic-field responsive reversible assembling behavior, (d) end-capper protein modulates the nanotube length and cell internationalization

首先,GroEL 蛋白大环可以像有机大环一样刺激性响应释放客体^[38]。如图 3a 所示,2~3nm 的 QD 客体可结合存储在 GroEL 蛋白的空腔内。在 ATP 和 Mg^{2+} 的共同存在下,GroEL 大环口发生水解,使开口变大,因此 QD 客体可被释放出来。

其次,GroEL 蛋白环可进行表面官能团修饰(见图 3a)^[39]。利用分子生物学方法,GroEL 蛋白环口上的 7 个丙氨酸可被定点突变为半胱氨酸(Cys),且不影响 GroEL 蛋白结构的稳定性。因此,Aida 等利用含偶氮基团的马来酰亚胺衍生物与半胱氨酸的巯基反应,在 GroEL 口上成功构筑了既对 ATP 响应、

又受紫外光控制的“AND 逻辑门”,使蛋白机器对客体(蛋白)的识别存在一种逻辑可控的运行方式。

Aida 等还成功将螺吡喃修饰的 GroEL 蛋白大环与镁离子配位构筑了一类新型蛋白纳米管(见图 3b)^[40]。由于螺吡喃分子的闭环状态(SP,螺吡喃结构)与开环状态(MC,部花菁结构)受紫外光控制,因此该蛋白纳米管也就变为受紫外光控解离。当然,如果 GroEL 桶状大环内结合了磁性粒子,其蛋白纳米管的聚集成束还可受磁场操控(见图 3c)^[41]。有意思的是,组装体中的金属配位作用并不影响伴侣蛋白独特的客体结合功能,以蛋白质分子伴侣 GroEL 的十四聚体“圆筒”为构筑基元,通过金属螯合作用形成的纳米管结构成为了良好的药物载体^[42]。载药的纳米管组装体跨过细胞膜进入细胞后,细胞内 ATP 驱动伴侣蛋白管口的结构发生变化,从而使纳米管解体,此时,酯酶进入蛋白圆筒内破坏了化学键,使药物释放出来。通过此方法,Aida 等将标记上荧光素的药物释放到细胞内。通过封端 End-Capper 蛋白调节 GroEL 蛋白纳米管的长度(见图 3d),有效实现了蛋白管的细胞内吞性质^[43]。

1.3 10nm 级直径的蛋白大环:Nanodisc 体系

磷脂蛋白纳米盘 Nanodisc 是一种和上述 SP1、GroEL 蛋白性质构造迥异的蛋白大环结构。在成分组成上,Nanodisc 由两亲性环状膜支架蛋白 MSPs(membrane scaffold proteins)和磷脂分子共同组成。在结构上,MSP 蛋白只有在包裹磷脂双分子层类膜结构(见图 4a)后才稳定地呈大环结构^[44]。2 个 MSP 蛋白分别头尾相接的环绕在磷脂双分子层外侧,其 Helix 构象平行于磷脂分子。MSP 蛋白的疏水残基位于 Helix 内侧,通过疏水作用与磷脂分子的疏水尾部相结合,亲水残基位于 Helix 外侧(见图 4b),使其以一个外径约 10nm、内径 7nm、高 5.5nm 的圆盘结构稳定存在于水相。

Nanodisc 中 MSP 内部以磷脂为介质,打破了大环化学一直以来环内以溶剂分子为介质的设计逻辑。由于 MSP 蛋白环内部和脂质之间具有很强的范德华作用,产生了巨大的焓效应,从而使 Nanodisc 间的磷脂交换变得十分缓慢,因而和脂质体(Liposome)相比,Nanodisc 中的磷脂双分子层在水相中具有惊人的稳定性,尺寸均一(约 10nm),且不随磷脂浓度变化而变化^[45]。

Nanodisc 中的 MSPs 源于天然载脂蛋白 ApoA-I,是血浆高密度脂蛋白(HDL)的主要组成部分,由多个串联重复的 α 螺旋组成。由于 HDL 富含磷脂,可促进胆固醇的代谢,降低心血管疾病的风险^[46]。ApoA-I 蛋白的过量表达可以前期抑制动脉粥样硬化的发展,促进症状的消退。因此,Nanodisc 上的环蛋白不仅可以有多种衍生体,同时其自身就具有极大的医学效应^[47]。

由于 Nanodisc 大环自身优异的两亲性质,从 Sligar 首次报道以来,它就被发现可作为膜通道蛋白的载体,并提供稳定且定量的膜蛋白结构构象,保证了环内的脂质数量和比例分布。随即,Nanodisc 就成为膜蛋白的“明星载体”,对确定膜蛋白结构以及进行功能研究发挥了巨大作用^[48]。一些极具挑战性的膜蛋白,如 GPCRs 或转运蛋白复合物等^[49],在 Nanodisc 纳米盘中稳定地组装起来,并保持与在天然细胞膜中相似的功能状态。Nanodisc 负载的膜蛋白还可提升膜蛋白在冷冻透射电镜(cryoTEM)的解析分辨率^[50],使科学家能够成功拍摄膜蛋白形成瞬间。

西北工业大学的葛岩等在 Nanodisc 磷脂蛋白大环中插入膜通道蛋白(SecY),研究核糖体(Ribosome)合成的膜蛋白疏水肽穿膜过程中与通道蛋白 SecY 的作用机制^[51]。他们通过在膜通道蛋白 SecY 上构建荧光猝灭系统,研究发现当空的核糖体靠近膜上的通道蛋白时,通道蛋白的开关部分开启。当携带由疏水氨基酸组成的信号肽链的核糖体与细胞膜通道蛋白相互作用时,疏水信号肽插入到膜通道蛋白 SecY 中,此时膜上的通道蛋白 SecYEG 的开关才会全部打开。相反,如果该新生肽链由非疏水氨基酸组成时,膜通道开关不会全部开启。而且,研究表明,该通道蛋白 SecY 的开关与温度相关,在较低温度如 4℃下核糖体与膜通道蛋白相互作用时,开关处于关闭状态。通过对核糖体合成新生肽链过程中膜通道蛋白的开关机制的研究,说明了膜通道蛋白 SecY 具有开或关的动态构象变化结构,这种动态构象的变化是通过识别核糖体或疏水肽链及非疏水肽链来实现的,解释了当时学术界对膜通道蛋白开关机制的一些争议。葛岩等所构建的荧光猝灭的方法为其他同行的研究提供了新的思路,引入 Nanodisc 作为膜通道蛋白的载体,提供了稳定且定量的膜蛋白结构构象,保证了脂质的数量和比例分布,是非常有效的研究

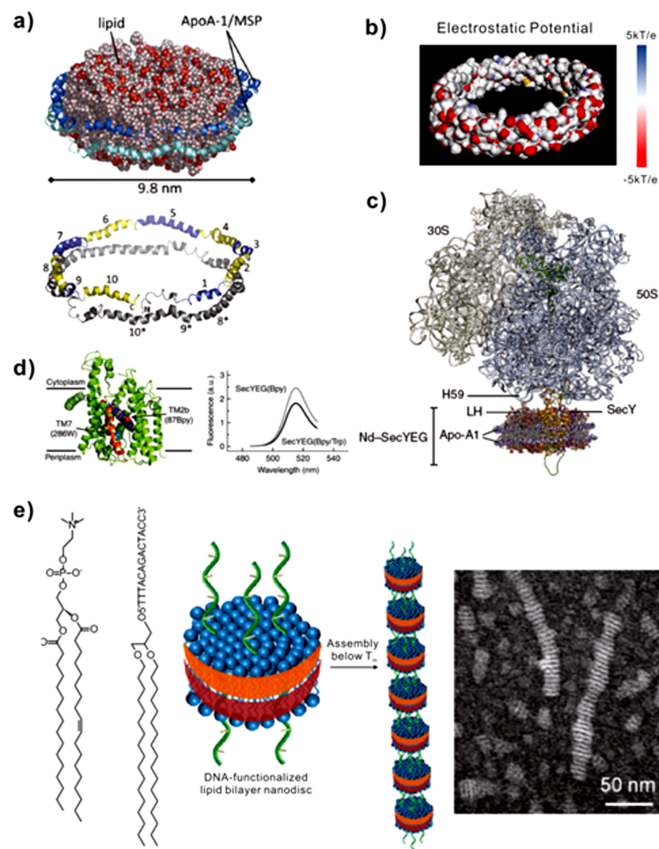


图 4 (a)磷脂蛋白纳米盘 Nanodisc 的构造,(b)MSP 大环内疏水、外亲水的性质, (c)Nanodisc 大环内插入膜通道蛋白 SecY,与核糖体形成蛋白复合物,(d)膜通道蛋白 SecY 上构建荧光猝灭系统,(e)DNA 修饰的 Nanodisc 自组装成 1D 纳米线

Figure 4 (a) Model of a nanodisc, based on the discoidal double-belt apolipoprotein A-1 model, (b) electrostatic potential of scaffold protein MSP, (c) All-atom model of the active 70S-RNC-Nd-SecYEG complex, (d) PET between fluorophores at the rim of the lateral gate of the translocon, (e) complementary DNA functionalized nanodiscs self-assemble into nanowires

手段。

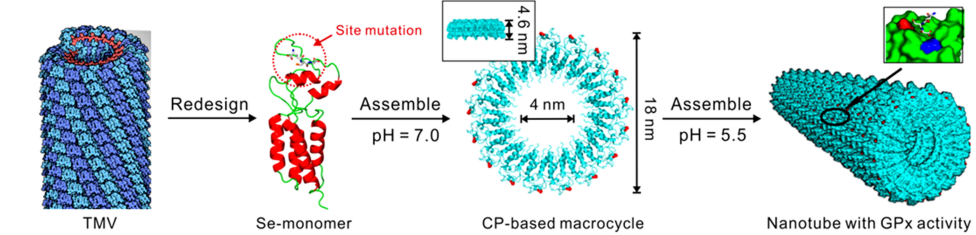
此外,Nanodisc 大环中的磷脂也可被修饰用于自组装,如 Sligar 等在磷脂上修饰 DNA 单链(见图 4e)^[52]。由于碱基对互补序列,因此可以使 Nanodisc 互相堆叠,形成由自然界的三大组成元素——脂质、脱氧核糖核酸和蛋白质共同组成的 1D 的生物纳米线。

1.4 10nm 级直径的蛋白大环:CP 体系

衣壳蛋白 (Capsid protein,CP) 是另一类重要的自组装蛋白大环。CP 是病毒的蛋白质外壳,又称为壳体,用来包裹病毒的遗传物质(核酸)。天然烟草花叶病毒衣壳蛋白(TMV CP)就是一类研究较为透彻的衣壳蛋白,具有稳定好、产率高、晶体结构明确等特点。在不同 pH 下,TMV 可以在蛋白大环与螺旋纳米管之间相互转化(见图 5a)。刘俊秋等利用 TMV 蛋白的这一特性,展示了一类以丝状病毒 CP 为来源的人工纳米酶构筑方法^[53]。他们通过计算机分析,在 TMV 蛋白单体上选择了一个合适的底物结合位点,例如,将 142 位的丝氨酸(Ser)定点突变为半胱氨酸(Cys),从而引入 GPx 的催化中心硒代半胱氨酸(Sec)。同时又将邻近 149 位甘氨酸(Gly)突变为精氨酸,与 141 位的精氨酸相互配合用于识别和稳定 GPx 的底物谷胱甘肽(GSH),得到一个具有多个 GPx 催化活性中心的 TMV 蛋白大环和纳米管。在多硒酶中心的帮助下,由此产生的病毒基纳米酶表现出惊人的 GPx 活性,甚至接近天然 GPx 的水平。对

亚细胞线粒体水平的抗氧化研究表明,该纳米酶具有良好的保护细胞免受氧化损伤的能力。

a) Tobacco mosaic virus



b) Ferritin

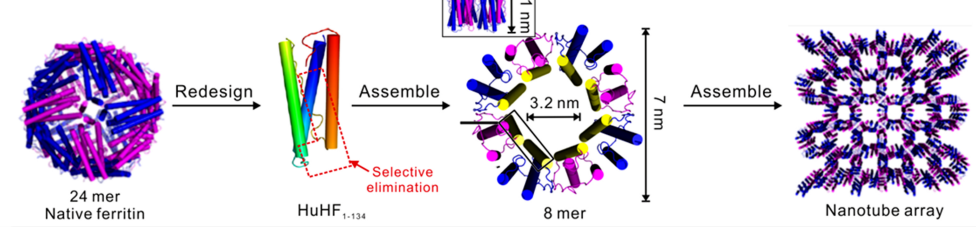


图 5 (a)将烟草花叶病毒衣壳蛋白改造成含硒 GPx 人工纳米酶,(b)将天然 24 聚体的铁蛋白纳米笼转化为 8 聚体蛋白大环

Figure 5 (a) Assembly of GPx mimic Se-containing TMV CP into artificial nanoenzyme, (b) conversion of native 24-mer Ferritin protein-nanocage into 8-mer protein-macrocycle

Zhao 和 Wang 等则展示了如何将笼状(Cage)蛋白的壳蛋白分子改造成蛋白大环的设计策略,并进而自组装成多孔蛋白二维材料^[54]。铁蛋白为机体内一种贮存铁的可溶组织蛋白,由一层蛋白壳围绕着磷酸盐分子和铁组成的铁核。虽然从严格意义上来说其并不是衣壳蛋白,但是其 Cage 状结构具备许多病毒 CP 的关键特种,因此提供了极大的借鉴意义。人源铁蛋白外壳(即所谓的脱铁铁蛋白)由 24 个 HuHF 亚基组成,其天然 HuHF 壳蛋白 C 端的一段 49 个残基的肽链结构通过基因消除法移除,得到了具有新的对称结构的 HuHF₁₋₁₃₄,结果将笼状的铁蛋白转变成由 8 个亚基组成的蛋白大环(见图 5b)。这种基于铁蛋白的蛋白大环外径约 7nm,内径 3.2nm,高 5.1nm。他们成功获得了 HuHF₁₋₁₃₄ 蛋白大环的晶体结构,并意外发现,这种新形成的蛋白大环通过氢键使环与环之间相互联接,形成罕见的蛋白多孔 2D 材料。这一结果为制备新型生物二维纳米材料提供了新思路。

1.5 20nm 级直径的蛋白大环:DHFR 体系

酶与底物的相互作用是蛋白大环形成的又一有效组装策略,为人工纳米材料的制备提供广阔的发展空间。所谓底物类似物就是与底物结构相似或是经过修饰的底物,可以代替底物而与酶特异性结合。因此,当原底物不适合组装条件时,可以设计一个更有利的底物类似物来代替底物作为蛋白识别的配体,构筑蛋白超分子组装体。

Wanger 等以融合的二氢叶酸还原酶(DHFR)为构筑基元,通过其底物类似物二价氨甲叶酸衍生物(bisMTX)的结合作用,构筑了稳定的蛋白大环 CSAN(见图 5)^[55]。随着其中的 DHFR 酶直接连接的肽的长短变化,蛋白大环的内直径可调控在 8~20nm 之间(见图 5a)。他们发现,向蛋白大环 CSAN 溶液中加入底物抑制剂,蛋白大环结构就会解散,从而证明了该结构是通过酶-底物类似物的专一性结合作用形成的。

借用蛋白融合技术的优势,一些重要的抗原可以十分便捷地被引入到蛋白大环上,从而使蛋白大环在免疫性识别和治疗领域的优势得到很好的展示。Wanger 等^[56]将骨架蛋白第十人纤维素类型 III 域(Fn3)融合到 DHFR 蛋白二聚体中(见图 5b)。当使用 Fn3 C5 克隆基因时,产生的抗原-DHFR 蛋白二聚体可表现出 EpCAM 的癌细胞特异性结合亲和力(即 Targeted);而当使用 Fn3 B22 克隆基因时,则得

到只有较低结合亲和力的抗原-DHFR 蛋白二聚体(即 Non-Targeted)。把这两种具有不同结合亲和力的抗原-DHFR 蛋白二聚体与 bisMTX 组装,就可以构筑成一种新型多价(Multivalent)可识别抗上皮细胞黏着分子(EpCAM)抗体的蛋白大环,用以参与免疫识别反应。如图 5c 结果所示,该蛋白大环不仅提供了一个理想的模型用来研究骨架蛋白抗原和细胞膜抗体识别过程中的多价键作用过程,而且也给科学家提供了一种调节和优化表观结合亲和力药物缀合物或特异性识别抗上皮细胞粘附分子抗体在体外和体内检测的诊断试剂^[57]。

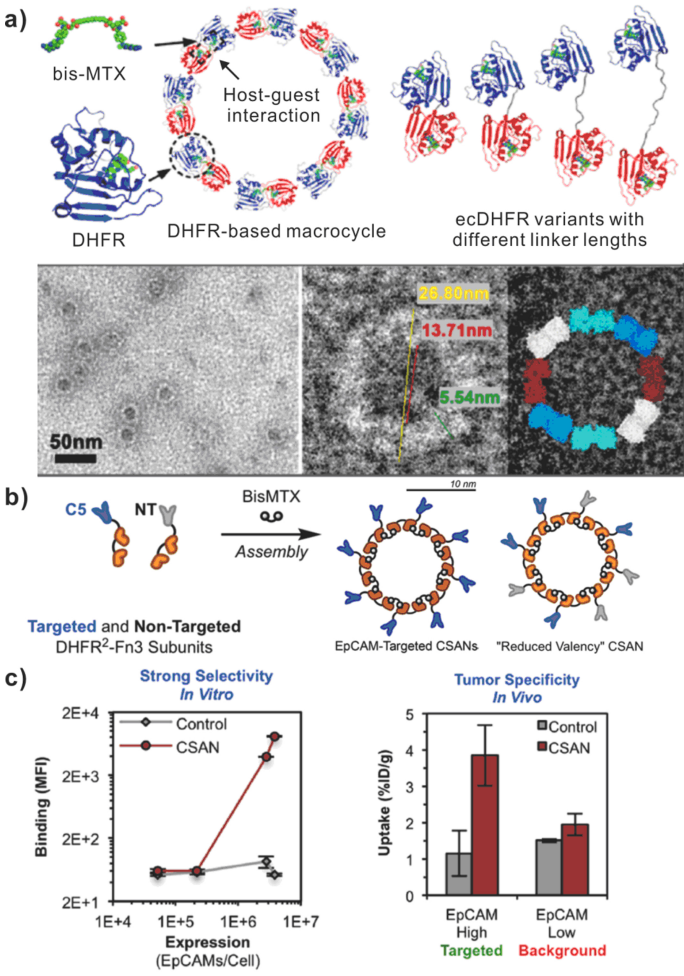


图 6 (a)二氢叶酸还原酶 DHFR 为构筑基元与其底物类似物 bisMTX 结合作用构筑蛋白大环 CSAN, (b)、(c)CSAN 上引入抗原构筑多价识别体系,开发其在免疫性识别和癌症治疗方面的功能

Figure 6 (a) Bis-MTX and DHFR system self-assemble into protein-macrocycle via the host-guest interaction, (b) CSAN-antigen conjugates; multivalent ligand binding to cell membrane antigens, (c) strong selectivity *in vitro* and tumor specificity *in vivo*

1.6 100 nm 级直径的蛋白大环: GST 体系

生物蛋白大分子给予了科学家更大的自由度来设计直径高达 100nm 以上的超级大环。在这一方面,刘俊秋等提出了空间设计与超分子作用协同的设计策略,利用金属螯合作用诱导蛋白质自组装,实现了可预见性的蛋白超大环的设计与构建(见图 6)^[58]。他们选用了一种来自日本血吸虫的传统二聚体蛋白谷胱甘肽硫转移酶(sjGST)作为目标构筑基元。通过基因融合的办法,将传统的 Ni²⁺ 配体组氨酸标签(His-tags)引入到 GST 的 N 末端,使 GST 蛋白引入金属螯合位点,以“V”字型排列在 sjGST 表面并沿着该二聚体 C2 对称的金属螯合位点(见图 6a)。通过计算机模拟发现,所设计的金属螯合空间位点排布

能产生空间诱导的协同作用效果,对 sjGST 组装成蛋白大环结构十分有利。在这种情况下,最终可得到的蛋白质纳米环都具有超大直径($367\pm10\text{nm}$)。由于非共价键相互作用的存在,这些纳米环的直径可以通过溶液离子强度来进一步调控。他们将 GST-2His 与等摩尔量的 Ni^{2+} 在不同盐浓度的 Tris 缓冲体系中进行自组装。结果显示,在含有 10mmol/L NaCl 盐浓度的缓冲溶液中,GST-2His 自组装成直径约为 165nm 的中等大小的蛋白质环;当盐浓度增加至 30mmol/L 时,蛋白质环的直径缩小为 96nm 。在此条件下,受空间位阻、环张力以及组装体稳定性的限制,环的尺寸已经不能进一步地缩小;在 50mmol/L 盐浓度的条件下,组装体会变得不规整。

这些纳米环与那些利用特定几何取向及精确控制蛋白相互作用的环线竞争机制得到的蛋白环有所不同。在这种情况下,可以得到直径一致的有序半环结构,这在环线竞争机制中是观察不到的。显然,这项研究为精确控制和预测蛋白质组装体提供了方向,同时也为接下来设计构建更加复杂的蛋白质超结构做了很好的铺垫。

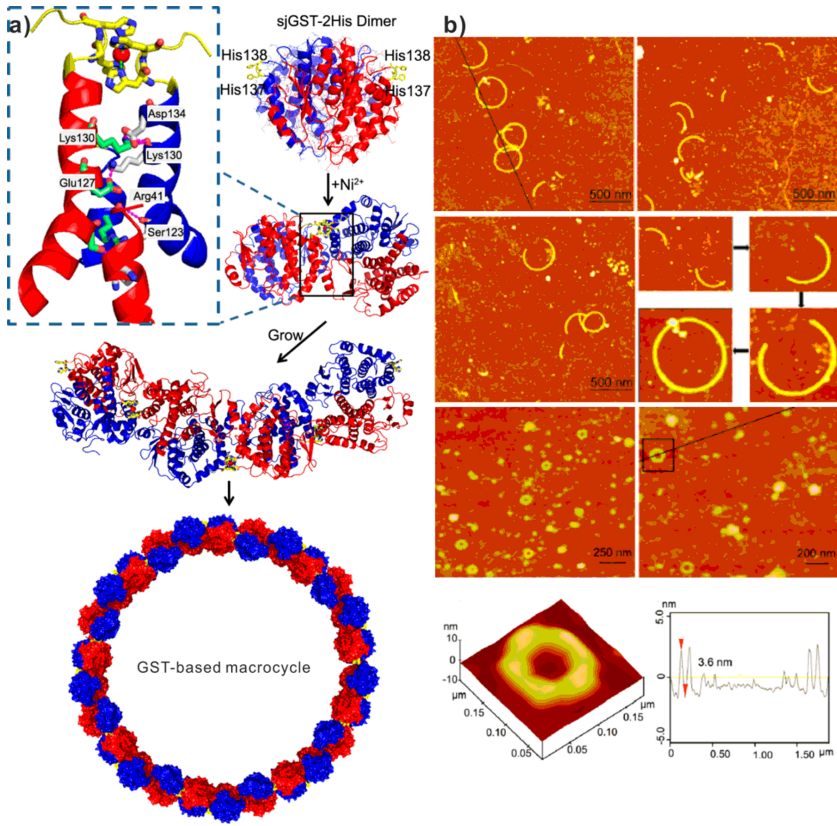


图 7 (a)sjGST 蛋白构筑的 100nm 级的超级蛋白大环,(b) AFM 表征 sjGST 蛋白大环结构

Figure 7 (a) SjGST variants self-assemble into highly protein-macrocycles with diameter over 100nm, (b) AFM images of ‘big’ protein macrocycles

2 结语

蛋白质是自然进化的生物大分子,具有高度复杂的结构和不同的特性。通过超分子相互作用将蛋白质设计和控制的自组装组装成聚合物结构,为理解自发的自组织过程和各种生物活性材料的制造提供了独特的优势。本文重点介绍了几类成功开发的蛋白大环结构及其自组装和功能化过程,充分展现了科学家们在操控复杂生物大分子中的高超技艺。同时,由于蛋白基元的复杂性,计算机模拟在其中担当着极其重要的位置。从目前看,蛋白质大环为构建功能高分子提供了一个全新的思路 and 平台。这一领域

目前虽然才刚刚起步,但蛋白大环的自组装及其功能化研究潜力巨大。随着蛋白自组装行为的动力学和热力学机制得到更为深入的了解,操控蛋白自组装过程将变得更为娴熟。

参考文献:

- [1] Luo Q, Hou C X, Bai Y S, Wang R B, Liu J Q. Chem Rev, 2016, 116:13571.
- [2] Yang G, Zhang X, Kochovski Z, Zhang Y F, Dai B, Sakai F, Lin Jiang, Lu Y, Ballauff M, Li X M, Liu C, Chen G S, Jiang M. J Am Chem Soc, 2016, 138: 1932.
- [3] Shao Y, Jia H Y, Cao T Y, Liu D S. Acc Chem Res, 2017, 50: 659.
- [4] Qi Z H, Schalley C A. Acc Chem Res, 2014, 47: 2222.
- [5] Akira H, Li J, Mikiharu K. Nature, 1992, 356: 325.
- [6] Kim J, Jung I S, Kim S Y, Lee E, Kang J K, Sakamoto S, Yamaguchi K, Kim K. J Am Chem Soc, 2000, 122: 540.
- [7] Xue M, Yang Y, Chi X D, Zhang Z B, Huang F H. Acc Chem Res, 2012, 8: 1294.
- [8] Guo Q H, Fu Z D, Zhao L, Wang M X. Angew Chem Int Ed, 2014, 53: 13548.
- [9] Chen H, Fan J, Hu X, Ma J, Wang S, Li J, Yu Y, Jia X, Li C. Chem Sci, 2015, 6: 197.
- [10] Tian X H, Chen C F. Org Lett, 2010, 12: 524.
- [11] Wang J H, Feng H T, Zheng Y S. Chem Commun, 2014, 50: 11407.
- [12] Zhou H J, Zhao Y S, Gao G, Li S Q, Lan J B, You J S. J Am Chem Soc, 2013, 135: 14908.
- [13] Lee S, Chen C H, Flood A H. Nat Chem, 2013, 5: 704.
- [14] Huang G B, Wang S H, Ke H, Yang L P, Jiang W. J Am Chem Soc, 2016, 138: 14550.
- [15] Tan L L, Li H, Tao Y, Zhang S X A, Wang B, Yang Y W. Adv Mater, 2014, 26: 7027.
- [16] Si W, Chen L, Hu X B, Tang G F, Chen Z X, Hou J L, Li Z T. Angew Chem Int Ed, 2011, 50: 12564.
- [17] Yu G, Ma Y, Han C, Yao Y, Tang G, Mao Z, Gao C, Huang F H. J Am Chem Soc, 2013, 135: 10310.
- [18] Cao Y, Hu X Y, Li Y, Zou X C, Xiong S H, Lin C, Shen Y Z, Wang L Y. J Am Chem Soc, 2014, 136: 10762.
- [19] Dong S, Leng J, Feng Y, Leng J, Feng Y X, Liu M, Stackhouse C J, Schönhals A, Chiappisi L, Gao L Y, Chen W, Shang J, Jin L, Qi Z H, Schalley C A. Sci Adv, 2017, 3: eaao0900.
- [20] Ke H, Yang L P, Xie M, Chen Z, Yao H, Jiang W. Nat Chem, 2019, 11: 470.
- [21] Villar E A, Beglov D, Chennamadhavuni S, Porco Jr J A, Kozakov D, Vajda S, Whitty A. Nat Chem Biol, 2014, 10:723.
- [22] Huang P S, Boyken S E, Baker D. Nature, 2016, 537: 320.
- [23] Fegan A, White B, Carlson J C T, Wagner C R. Chem Rev, 2010, 110: 3315.
- [24] Shadish J A, Benuska G M, DeForest C A. Nat Mater, 2019, DOI: 10.1038/s41563-019-0367-7.
- [25] Kuan S L, Bergamini F R G, Weil T. Chem Soc Rev, 2018, 47: 9069.
- [26] Luo Q, Hou C X, Bai Y S, Wang R B, Liu J Q. Chem Rev, 2016, 116: 13571.
- [27] Zhao L L, Qiao S P, Liu J Q. Sci China Chem, 2016, 59: 1531.
- [28] Yang L, Liu A, Cao S, Putri R M, Jonkheijm P, Cornelissen J J. Chem Eur J, 2016, 22: 15570.
- [29] Bai Y S, Luo Q, Liu J Q. Chem Soc Rev, 2016, 45: 2756.
- [30] Zhao L L, Zou H Y, Zhang H, Sun H C, Wang T T, Pan T Z, Li X M, Bai Y S, Qiao S P, Luo Q, Xu J Y, Hou C X, Liu J Q. ACS Nano, 2017, 11: 938.
- [31] Miao L, Fan Q S, Zhao L L, Qiao Q L, Zhang X Y, Hou C X, Xu J Y, Luo Q, Liu J Q. Chem Commun, 2016, 52: 4092.
- [32] Miao L, Han J S, Zhang H, Zhao L L, Si C Y, Zhang X Y, Hou C X, Luo Q, Xu J Y, Liu J Q. ACS Nano, 2014, 8: 3743.
- [33] Qi Z H, Schlaich C, Schalley C A. Chem Eur J, 2013, 19: 14867.
- [34] Sun H C, Zhang X Y, Miao L, Zhao L L, Luo Q, Xu J Y, Liu J Q. ACS Nano, 2015, 10: 421.
- [35] Sun H C, Miao L, Li J X, Fu S, An G, Si C Y, Dong Z Y, Luo Q, Yu S J, Xu J Y, Liu J Q. ACS Nano, 2015, 9: 5461.
- [36] Li X M, Qiao S P, Zhao L L, Liu S D, Li F, Yang F H, Luo Q, Hou C X, Xu J Y, Liu J Q. ACS Nano, 2019, 13: 1861.
- [37] Sim S, Aida T. Acc Chem Res, 2017, 50: 492.
- [38] Ishii D, Kinbara K, Ishida Y, Ishii N, Okochi M, Yohda M, Aida T. Nature, 2003, 423: 628.
- [39] Muramatsu S, Kinbara K, Taguchi H, Ishii N, Aida T. J Am Chem Soc, 2006, 128: 3764.
- [40] Biswas S, Kinbara K, Oya N, Ishii N, Taguchi H, Aida T. J Am Chem Soc, 2009, 131: 7556.
- [41] Sim S, Miyajima D, Niwa T, Taguchi H, Aida T. J Am Chem Soc, 2015, 137: 4658.
- [42] Biswas S, Kinbara K, Niwa T, Taguchi H, Ishii N, Watanabe S, Miyata K, Kataoka K, Aida T. Nat Chem, 2013, 5: 613.

- [43] Sim S, Niwa T, Taguchi H, Aida T. J Am Chem Soc, 2016, 138: 1115.
- [44] Ilia G D, Stephen G S. Chem Rev, 2017, 117, 6: 4669.
- [45] Hagn F, Nasr M L, Wagner G. Nat Protoc, 2017, 13: 79.
- [46] Rader D J, Hovingh G K. Lancet, 2014, 384: 618.
- [47] Kuai R, Li D, Chen Y E, Moon J J. ACS Nano, 2016, 10: 3015.
- [48] Denisov I G, Sligar S G. Nat Struct Mol Biol, 2016, 23: 481.
- [49] Gu L C, Li C, Aach J, Hill D E, Vidal M, Church G M. Nature, 2014, 515: 554.
- [50] Gao Y, Cao E, Julius D, Cheng Y. Nature, 2016, 534: 347.
- [51] Ge Y, Albená D, Thomas B, Marina V R, Wolfgang W. Nat Commun, 2014, 5: 5263.
- [52] Paul A B, Nienke G, Krishna K I, Hideki S, Corey J W, T. Kyle V. J Am Chem Soc, 2013, 135: 3335.
- [53] Hou C X, Luo Q, Liu J L, Miao L, Zhang C Q, Gao Y Z, Zhang X Y, Xu J Y, Dong Z Y, Liu J Q. ACS Nano, 2012, 6: 8692.
- [54] Wang W M, Wang L L, Chen H, Zang J C, Zhao X, Zhao G H, Wang H F. J Am Chem Soc, 2018, 140: 14078.
- [55] Carlson J C T, Jena S S, Flenniken M, Chou T F, Siegel R A, Wagner C R. J Am Chem Soc, 2006, 128: 7630.
- [56] Csizmar C M, Petersburg J R, Perry T J, Rozumalski L, Hackel B J, Wagner C R. J Am Chem Soc, 2019, 141: 251.
- [57] Petersburg J R, Shen J, Csizmar C M, Murphy K A, Spanier J, Gabrielse K, Griffith T S, Fife B, Wagner C R. ACS Nano, 2018, 12: 6563.
- [58] Bai Y S, Luo Q, Zhang W, Miao L, Xu J Y, Li H B, Liu J Q. J Am Chem Soc, 2013, 135: 10966.

Progress in Self-Assembly and Functionalization of Protein-based Macrocycles

XU Qiang-qiang, GONG Han-lin, SHANG Jie, PAN Tie-zheng, GE Yan^{*}, QI Zhen-hui^{*}

(Synergetic Innovation Center of Flexible Electronics and Healthcare Science of Shaanxi Province, Sino-German Joint Research Lab of Space Biomaterials and Translational Technology, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: This review focuses on the recent progress of self-assembly and functionalization of protein-based macrocycles. Taking the most popular protein macrocycles as example, the structural features, fabrication strategies and functions of these well-explored protein-macrocycles were analyzed and compared. As a new kind of biogenic polymeric macrocycle, protein-macrocycles serve as the evolutionary product of biopolymer science and macrocyclic chemistry. The protein-macrocyclic structure provides a novel design material and construction platform for fabrication of functional polymers. With the accumulated knowledge of kinetics and thermodynamic behaviors, the manipulation of the self-assembly process of protein-macrocycles will become skilled.

Key words: Protein-Macrocycle; Biopolymer; Macrocycle; Self-Assembly