

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201712002



# 蝌蚪状类弹性蛋白多肽 相变特性分析

邱岳, 张丹丹, 吴姝羽, 蔡征文, 林源清, 张光亚

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 为研究不同盐类型及浓度对蝌蚪状 ELPS<sub>40</sub> 相变特性的影响,探究霍夫曼斯特(Hofmeister)离子序中阴、阳离子对蝌蚪状 ELPS<sub>40</sub> 相变温度的影响,通过设计、表达和纯化后,获得由谍标签/捕谍器(SpyTag/Spy-Catcher),以及由 40 个重复的线性类弹性蛋白多肽所形成的 2 个蝌蚪型结构的 ELPS<sub>40</sub>. 结果表明:蝌蚪状 ELPS<sub>40</sub> 相变温度比 ELPS<sub>80</sub> 相变温度高 1.35 °C;阴离子对蝌蚪状 ELPS<sub>40</sub> 相变温度的影响符合 Hofmeister 离子序现象,但 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> 等阳离子却发生逆 Hofmeister 离子序现象;在 NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等不同浓度缓冲液中,蝌蚪状 ELPS<sub>40</sub> 发生相变所需的温度范围显著高于线性 ELPS<sub>40</sub>,这与其特殊的结构密切相关.

**关键词:** 蛋白拓扑结构; 蝌蚪状 ELPS<sub>40</sub>; 相变温度; Hofmeister 离子序; 构效关系

**中图分类号:** Q 35 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2018)03-0414-06

## Phase Transition Behavior of Tadpole-Like Elastin-Like Polypeptides

QIU Yue, ZHANG Dandan, WU Shuyu, CAI Zhengwen,  
LIN Yuanqing, ZHANG Guangya

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to study the effects of different salt types and concentrations on the phase transition characteristics of elastin-like polypeptides 40 (ELPS<sub>40</sub>), the influence of the anions and cations in the Hofmeister on the phase transition temperature of ELPS<sub>40</sub> was investigated. After designing, expressing and purifying, the ELPS<sub>40</sub> with the SpyTag/SpyCatcher and two 40-repetitive linear elastin-like peptides were obtained. The results show that the phase transition temperature of ELPS<sub>40</sub> is higher with 1.35 °C than that of the ELPS<sub>80</sub>. The effect of anions on the phase transition temperature of ELPS<sub>40</sub> accords with Hofmeister, but the cations such as NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> have inverse Hofmeister; in the buffers with different concentrations such as NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, etc., temperature range required for phase transition of the tadpole-like ELPS<sub>40</sub> is significantly higher than that of the linear ELPS<sub>40</sub>, which should be closely related to its special structure.

**Keywords:** protein topology; tadpole-like ELPS<sub>40</sub>; phase transition temperature; Hofmeister ion sequence; structure-activity relationship

类弹性蛋白多肽(ELPs)由 Val-Pro-Gly-Xaa-Gly(VPGXG)<sub>n</sub> (一般 10<n<200)组成<sup>[1-2]</sup>. ELPs 能

收稿日期: 2017-12-04

通信作者: 张光亚(1975-),男,教授,博士,主要从事酶与智能多肽的研究. E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21376103);福建省自然科学基金资助项目(2017J01065)

在很窄的温度范围内(约 1~2 °C)经历一个可逆相变过程<sup>[3]</sup>. 其中,阴、阳离子是引起 ELPs 发生相变的关键因素之一,其触发 ELPs 相变一般遵循霍夫曼斯特(Hofmeister)离子序<sup>[4]</sup>. 谍标签/捕谍器(SpyTag/SpyCatcher)来源于革兰氏阳性菌酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白中的免疫球蛋白二级结合区域(CnaB2)<sup>[5]</sup>,CnaB2 有一个稳定性极高的异肽键<sup>[6]</sup>. 基于 SpyTag/SpyCatcher 基因的重组特性, SpyTag/SpyCatcher 可将线性 ELPs 构建成不同拓扑结构的 ELPs,极大丰富了传统线性 ELPs 的结构形式和应用领域<sup>[7-8]</sup>. 但有关拓扑结构各异的 ELPs 相变特性及 SpyTag/SpyCatcher 对 ELPs 相变温度的影响规律报道较少<sup>[9-11]</sup>. 本文以 40 个重复的 ELPs<sub>40</sub> 作为研究对象,研究不同盐类型及浓度对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变特性的影响,并探究 Hofmeister 离子序中阴、阳离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响.

# 1 材料与方法

## 1.1 载体构建

所设计的蛋白结构,如图 1 所示. 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub>,如图 1(a)所示;酶切后得到线性类弹性蛋白,如图 1(b)所示;通过 *Nde* I 和 *Hind* III 限制性内切酶进行酶切,酶切成功后克隆至 pET-22b(+)表达载体中,并转入 *E. coli* BL21(DE3)宿主菌,如图 1(c)所示. 全基因片段 SpyTag-ELPs<sub>40</sub>-TEV-SpyCatcher-ELPs<sub>40</sub> 由江苏省苏州金唯智生物科技有限公司合成并测序;SpyTag/SpyCatcher 的基因序列参见文献[5-7];ELPs<sub>40</sub> 基因为实验室前期合成<sup>[9]</sup>.

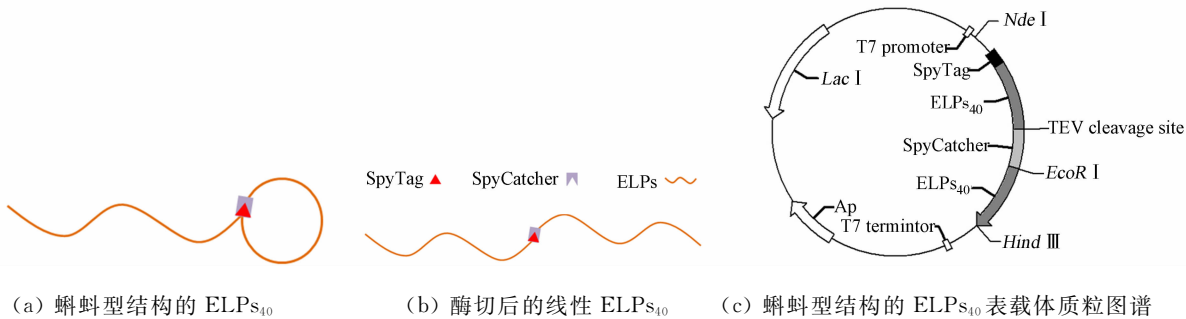


图 1 蝌蚪型结构的 ELPs<sub>40</sub> 蛋白构建示意图

Fig. 1 Schematic illustration of construct tadpole-like ELPs<sub>40</sub>

## 1.2 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 分子的表达和纯化

将含目的基因的载体宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)在氨苄青霉素(100 μg · mL<sup>-1</sup>)LB 培养基中过夜培养(37 °C),继而接种到 TB 培养基中继续培养. 在 TB 培养基中加入 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 异丙基-β-硫代吡喃半乳糖苷,在 25 °C 中诱导表达. 随即常温离心大肠杆菌菌液,将沉淀重悬于预冷的磷酸缓冲液(PBS 缓冲液,pH=7.4)中,并去除沉淀<sup>[9]</sup>. 融合蛋白蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的纯化采用可逆相变循环(ITC)法<sup>[12-13]</sup>,即添加固体 NaCl(2.5 mol · L<sup>-1</sup>),并在 38 °C 下保温 20 min 以触发 ELPs<sub>40</sub> 相变. 然后,在 40 °C (12 000 r · min<sup>-1</sup>, 10 min)离心弃上清,将再溶解的沉淀物在 4 °C (12 000 r · min<sup>-1</sup>, 10 min)离心以除去不溶物. 最后,收集含有目的蛋白的上清液. 为得到高纯度的蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub>,可再重复上述过程.

## 1.3 蛋白特性

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)初步验证蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的纯度和相对分子质量. 为精确测定蛋白相对分子质量,用超滤离心管除盐后,利用 UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(美国布鲁克道尔顿公司),以芥子酸为基质测定<sup>[14]</sup>. 其理论相对分子质量在 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)中计算. 使用 SPECPRD40 型紫外-可见分光光度计(德国 Analytik Jena AG 公司)于 280 nm 处测定纯蛋白消光系数,与色氨酸(Trp)在 280 nm 处消光系数的标准曲线对比可确定其浓度<sup>[15]</sup>.

盐对 ELPs<sub>40</sub> 相变温度影响的测定. 终浓度为 25 μmol · L<sup>-1</sup> 的 ELPs<sub>40</sub> 与不同浓度梯度的盐混匀后(溶于 PBS 缓冲液,pH=7.4)备用. 相变温度定义为程序升温过程中,*D*(350)(波长为 350nm 时,测得的消光系数)最大值一半时所对应的温度<sup>[16]</sup>. 相变温度的测定由配置有温控装置的紫外-可见分光光度

计完成.

1.4 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 分子的蛋白酶切

根据烟草蚀斑病毒蛋白酶(TEV)的产品说明书,46  $\mu\text{L}$  蛋白样品加入 4  $\mu\text{L}$  TEV 混合物,于室温下过夜酶切.蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> (由一个环化 ELPs<sub>40</sub> 与一个线性 ELPs<sub>40</sub> 连接组成的结构)经蛋白酶酶切后形成含有 2 个 ELPs<sub>40</sub> 的线性结构(E-T-E 分子,两端是 ELPs<sub>40</sub>,中间一段是 Spytag),如图 1(a),(b)所示. ELPs<sub>80</sub> 是指包含 2 个 ELPs<sub>40</sub> 的线性结构,但没有 SpyTag 和 SpyCatcher.

2 结果与讨论

2.1 蛋白的表达、纯化及鉴定

通过 SpyTag/SpyCatcher 将 ELPs<sub>40</sub> 设计成蝌蚪型结构,表达和纯化后获得的蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 经 TEV 蛋白酶酶切后(10~12 h),与未酶切的蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 进行 SDS-PAGE 纯度和相对分子质量的初步验证,如图 2 所示.图 2 中:M 为蛋白相对分子质量标准;1 泳道为蝌蚪型结构的 ELPs<sub>40</sub>;2 泳道为酶切后蝌蚪型结构的 ELPs<sub>40</sub>.由图 2 可知:1 泳道在 170 ku 左右有明显的杂条带,说明 SpyTag-ELPs<sub>40</sub>-TEV-SpyCatcher-ELPs<sub>40</sub> 蛋白自身反应形成蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 并未达到 100%,可能出现分子间异肽键的共价反应.电泳图经 BandScan 软件分析,有 90% 的 SpyTag-ELPs<sub>40</sub>-TEV-SpyCatcher-ELPs<sub>40</sub> 蛋白自身发生环化反应;2 泳道在 170 ku 左右的杂条带减少,比 1 泳道多 1 个相对分子质量为 48 ku 左右的 TEV 蛋白酶的条带.据文献[17]报道, $\beta$ -内酰胺酶经 SpyTag/SpyCatcher 自身环化,环化率约为 75%.文中对地衣多糖酶进行环化,自身环化率同样低于 100%,这主要由被环化分子氮端和碳端的距离决定<sup>[18]</sup>.经 2 轮纯化的蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 及 TEV 蛋白酶酶切后的 ELPs<sub>40</sub>,其精确相对分子质量由 UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪分析,结果如图 3 所示.图 3 中: $m/z$  为质荷比; $I_{\text{观测值}}$  为所检测到离子质荷比的观测值; $I_{\text{计算值}}$  为所检测到离子质荷比的计算值.由图 3 可知:蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 和经酶切 ELPs<sub>40</sub> 的相对分子质量分别为 50 607.5 u 和 50 629.1 u,与 ProtParam 计算值非常接近.由图 3(b)可知:经 TEV 蛋白酶酶切水解后的 ELPs<sub>40</sub> 相对分子质量增加约 18(即 1 分子水的相对分子质量),再次证实蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的成功环化所得分子与预期相符.

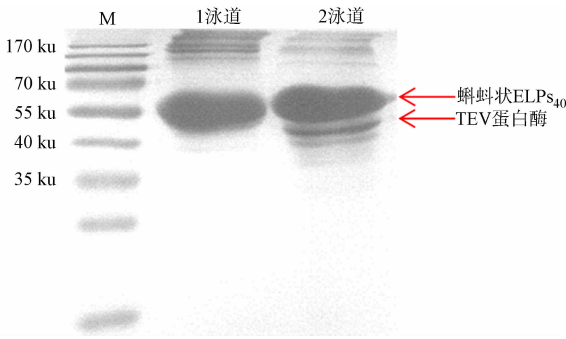


图 2 蝌蚪型结构的 ELPs<sub>40</sub> SDS-PAGE 分析  
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of construct tadpole-like ELPs<sub>40</sub>

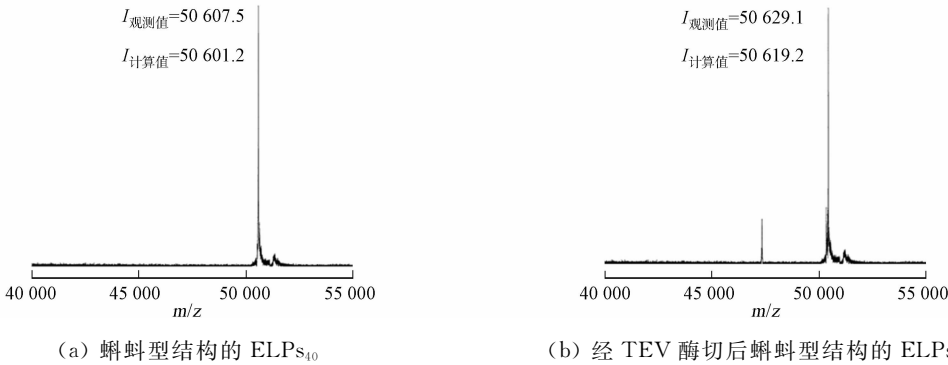


图 3 MALDI-TOFMS 质谱分析  
Fig. 3 MALDI-TOFMS mass spectrum analysis

2.2 NaCl 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 对不同拓扑结构 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响

以 NaCl 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 为例,测定它们对不同拓扑结构 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响,如图 4 所示.图 4 中: $t_{\text{T}}$  为相变温度; $c$  为盐浓度; $t_{\text{R}}$  为相对浊度; $t$  为温度.由图 4 可知:NaCl 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 对不同拓扑结构 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响呈线性相关,随着浓度的增加,相变温度均呈直线下降.由图 4(a),(b)可知:蝌

蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度均高于 ELPs<sub>80</sub> 和 E-T-E. 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub>, ELPs<sub>80</sub> 和 E-T-E 分子中, 都含有 2 个 ELPs<sub>40</sub> 重复数. 一方面, 因为分别融合 SpyTag/SpyCatcher 和 SpyTag; 另一方面, 由于拓扑结构的不同, 使 ELPs<sub>40</sub> 相变温度有所不同, 但相差不大. 在所测的 NaCl 溶液中, 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 分别与 ELPs<sub>80</sub>, E-T-E 平均相变温度相差 4.5 °C 和 2.3 °C, 且二者有相交的趋势. 在所测的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中, 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 与 ELPs<sub>80</sub> 相变温度最小相差 5 °C. 随着 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 浓度的增加, 二者的相变温度相差也越来越大. 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 比 E-T-E 的相变温度平均高出 4 °C.

蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 在含 NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的缓冲液中发生相变所需的温度范围很宽. 以蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 在不同浓度的 NaCl 缓冲液中的相变曲线为例, 结果如图 4(c) 所示. 由图 4(c) 可知: 在不同浓度的 NaCl 溶液中, 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变现象发生缓慢, 要经历很宽的温度范围(约 15 °C, NaCl 浓度为 2.0 mol · L<sup>-1</sup>)才能达到 D(350) 的最大值, 这与传统线性 ELPs<sub>40</sub> 相变发生在很窄的温度范围(约 1~2 °C)存在明显差异<sup>[19-20]</sup>. 而且, 随着 NaCl 浓度的升高, 温度范围呈增大的趋势, 这可能与蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的拓扑结构有关. 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的尾部是一个 ELPs<sub>40</sub> 分子, 头部是被 SpyTag/SpyCatcher 环化的 ELPs<sub>40</sub>, 随着外界温度的升高, 尾部的 ELPs<sub>40</sub> 位于蝌蚪型的表面会优先发生相变, 而头部环化的 ELPs<sub>40</sub> 在 SpyTag/SpyCatcher 的包围中, 且 SpyTag/SpyCatcher 表面带有较多的电荷会延缓相变现象的发生.

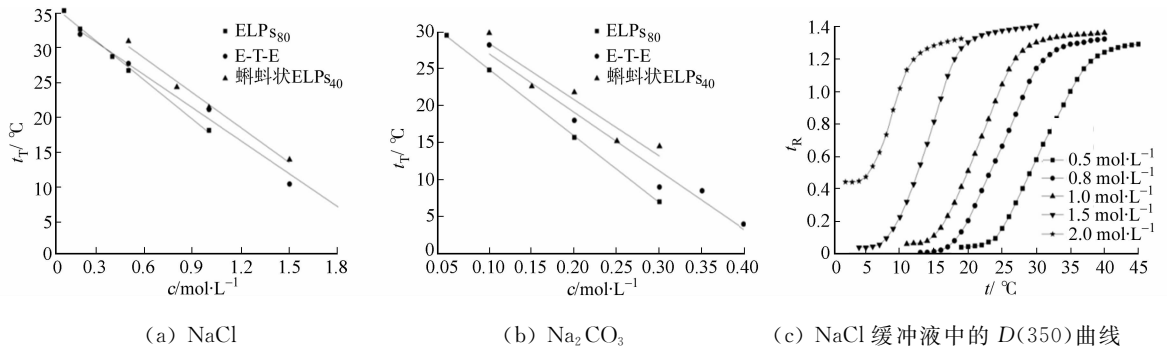


图 4 不同盐对不同拓扑结构 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响

Fig. 4 Influences of different salts on phase transition temperature of ELPs<sub>40</sub> with different topology structures

2.3 阴离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响

为进一步探究盐对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响是否符合 Hofmeister 离子序, 选取 4 种阴离子盐溶液进行研究<sup>[21-22]</sup>. 阴离子分别为 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 结果如图 5 所示. 由图 5 可知: 随着 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度的增加, 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度均呈线性减少. 这 4 种阴离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响顺序均为 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > Cl<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 这与文献[17]报道的结果一致, 符合 Hofmeister 离子序中阴离子对蛋白质溶解度的影响趋势. 在相同浓度的 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 和 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 溶液中, 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的大小比较接近, 它们与 Cl<sup>-</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 溶液中的相变温度相差较大, 其原因是 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 和 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 都是二价阴离子, 且在 Hofmeister 离子序中对相变温度的影响最大. Cl<sup>-</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 均为一价阴离子, 在 Hofmeister 离子序中属于对相变温度影响较小的阴离子.

2.4 阳离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 3 种阳离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响, 如图 6 所示. 由图 6 可知: 随着 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 浓度的增加, 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度呈线性下降. 由图 6(a) 可知: 3 种硫酸盐溶液对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响为 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> < K<sup>+</sup> < Na<sup>+</sup>, 且在相同浓度的 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中, 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度差距很小. 由图 6(b) 可知: 在 NaCl 与 KCl 溶液中, 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度非常接近, 而 NH<sub>4</sub>Cl 对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响依然最小. 相比之下, 硝酸盐的情况比较复杂, 如图 6(c) 所示. 由图 6(c) 可知: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 相变温度的趋势线与 NaNO<sub>3</sub> 有交点, 而 NaNO<sub>3</sub> 又与 KNO<sub>3</sub> 有交点. 即当 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的浓度小于 0.45 mol · L<sup>-1</sup> 时, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响强于 NaNO<sub>3</sub>; 而当 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的浓度大于 0.45 mol · L<sup>-1</sup> 时, 则相反; 当 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的浓度小于 1.05 mol · L<sup>-1</sup> 时, KNO<sub>3</sub> 对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度的影响强于 NaNO<sub>3</sub>; 当 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的浓度大于 1.05 mol · L<sup>-1</sup> 时, 则 Na<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> >

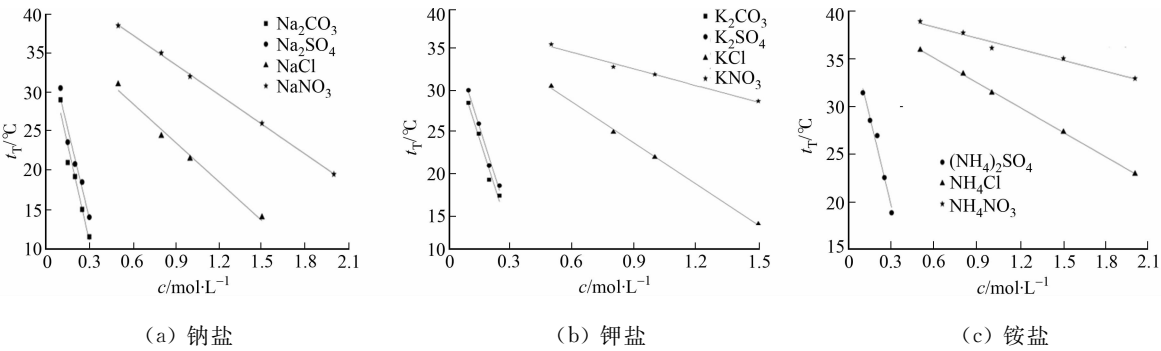


图 5 不同阴离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度影响

Fig. 5 Influence of different anions on phase transition temperature of tadpole-like ELPs<sub>40</sub>

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. 根据 Hofmeister 离子序<sup>[23]</sup>, NaNO<sub>3</sub> 对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度的影响强于 KNO<sub>3</sub>, 由于这种分界, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度的影响可分为 3 种, 即当硝酸盐的浓度小于 0.45 mol · L<sup>-1</sup> 时, K<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Na<sup>+</sup>; 当硝酸盐的浓度大于 0.45 mol · L<sup>-1</sup>, 小于 1.05 mol · L<sup>-1</sup> 时, K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (阳离子效应均不符合 Hofmeister 离子序); 当硝酸盐的浓度大于 1.05 mol · L<sup>-1</sup> 时, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> (此情况符合 Hofmeister 离子序<sup>[23]</sup>). 黄凯宗等<sup>[24]</sup> 研究 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 阳离子对线性 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响, 出现逆 Hofmeister 离子序, 其主要原因可能与 ELPs<sub>40</sub> 中的赖氨酸(K)与苯丙氨酸(F)有关. 苯丙氨酸会产生阳离子与  $\pi$  键的相互作用, 赖氨酸会使多肽产生屏蔽效应(screening effects). 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 中的 ELPs<sub>40</sub> 序列与之相同, 也含有苯丙氨酸残基和赖氨酸残基, 只是重复数更多<sup>[25]</sup>. 因此, 可推测阳离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响, 产生逆 Hofmeister 离子序不全是 SpyTag/SpyCatcher 造成的, 也和 ELPs<sub>40</sub> 本身的氨基酸残基有关.

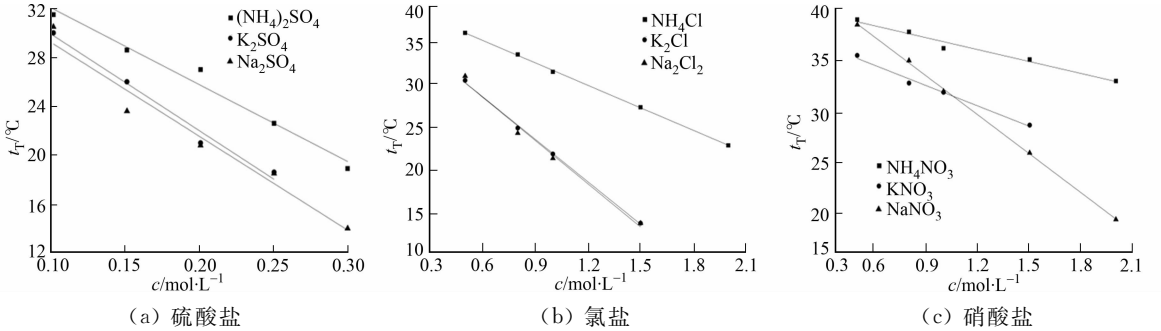


图 6 不同阳离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度影响

Fig. 6 Influences of different cations on phase transition temperature of tadpole-like ELPs<sub>40</sub>

3 结论

- 1) 在不同的盐溶液中, 发现蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度高于相同重复数的其他 ELPs<sub>40</sub>.
- 2) 由 Hofmeister 离子序中的阴、阳离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响可知: 阴离子对蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 相变温度的影响符合 Hofmeister 离子序, 而阳离子发生逆 Hofmeister 离子序.
- 3) 蝌蚪状 ELPs<sub>40</sub> 在含 NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的缓冲液中发生相变所需的温度范围很宽(最大可达 15 °C), 显著高于传统线性 ELPs<sub>40</sub> 的相变温度范围(1~2 °C), 且缓冲液中盐浓度越高, 温度范围越大, 这可能与特殊的拓扑结构有关.

参考文献:

[1] YEBOAH A, COHEN R I, RABOLLI C, *et al*. Elastin-like polypeptides: A strategic fusion partner for biologics[J]. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(8): 1617-1627. DOI: 10. 1002/bit. 25998.

[2] DESPANIE J, DHANDHUKIA J P, HAMM-ALVAREZ S F, *et al*. Elastin-like polypeptides: Therapeutic applications for an emerging class of nanomedicines[J]. J Controlled Release, 2015, 240(6): 93-108. DOI: 10. 1002/bit.

- 25998.
- [3] MEYER D E, CHILKOTI A. Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 846-851. DOI: 10. 1021/bm034215n.
- [4] BANKI M R, FENG L, WOOD D W. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags[J]. *Nat Methods*, 2005, 2(9): 659-661. DOI: 10. 1038/nmeth787.
- [5] AMELUNG S, NERLICH A, ROHDE M, *et al.* The FbaB-type fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* promotes specific invasion into endothelial cells[J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(8): 1200-1211.
- [6] HAGAN R M, BJORNSSON R, MCMAHON S A, *et al.* NMR spectroscopic and theoretical analysis of a spontaneously formed Lys-Asp isopeptide bond[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(45): 8421-8425.
- [7] LIM D W, NETTLES D L, SETTON L A. Rapid cross-linking of elastin-like polypeptides with (hydroxymethyl) phosphines in aqueous solution[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(5): 1463-1470. DOI: 10. 1021/bm061059m.
- [8] SUN F, ZHANG Wenbin, MAHDAVI A, *et al.* Synthesis of bioactive protein hydrogels by genetically encoded SpyTag-SpyCatcher chemistry[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2014, 111(31): 11269-11274.
- [9] 张丹丹, 蔡征文, 王金丹, 等. 不同拓扑结构类弹性蛋白相变特性及机理研究[J]. *中国科学: 化学*, 2016, 46(9): 881-890. DOI: 10. 1360/N032016-00002.
- [10] LIM D W, TRABBIC-CARLSON K, MACKAY J A, *et al.* Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(5): 1417-1424.
- [11] CHRISTENSEN T, HASSOUNEH W, TRABBIC-CARLSON K, *et al.* Predicting transition temperatures of elastin-like polypeptide fusion proteins[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(5): 1514-1519. DOI: 10. 1021/bm400167h.
- [12] CHOW D C, DREHER M R, TRABBIC-CARLSON K, *et al.* Ultra-high expression of a thermally responsive recombinant fusion protein in *E. coli*[J]. *Biotechnol Progr*, 2006, 22(3): 638-646. DOI: 10. 1021/bp0503742.
- [13] MACEWAN S R, HASSOUNEH W, CHILKOTI A. Non-chromatographic purification of recombinant elastin-like polypeptides and their fusions with peptides and proteins from *Escherichia coli*[J]. *J Vis Exp*, 2014, 9(88): e51583.
- [14] ZHANG Wenbin, SUN F, TIRRELL D A, *et al.* Controlling macromolecular topology with genetically encoded SpyTag-SpyCatcher chemistry[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(37): 13988-13997. DOI: 10. 1021/ja4076452.
- [15] GILL S C, HIPPEL P H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data[J]. *Anal Biochem*, 1989, 182(2): 319-326. DOI: 10. 1016/0003-2697(89)90602-7.
- [16] SCHOENE C, FIERER J O, BENNETT S P, *et al.* SpyTag/SpyCatcher cyclization confers resilience to boiling on a mesophilic enzyme[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53(24): 6101-6104. DOI: 10. 1002/anie. 201402519.
- [17] CURTIS R A, LUE L. A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions[J]. *Chem Eng Sci*, 2006, 61(3): 907-923. DOI: 10. 1002/anie. 201402519.
- [18] WANG Jindan, WANG Yilin, WANG Xinzhe, *et al.* Enhanced thermal stability of lichenase from *Bacillus subtilis* 168 by SpyTag/SpyCatcher-mediated spontaneous cyclization[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9(1): 79.
- [19] FERREIRA L A, COLE J T, REICHARDT C, *et al.* Solvent properties of water in aqueous solutions of elastin-like polypeptide[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(6): 13528-13547. DOI: 10. 3390/ijms160613528.
- [20] LI N K, GARCÍA Q F, HALL C K, *et al.* Molecular description of the LCST behavior of an elastin-like polypeptide[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(10): 3522-3530. DOI: 10. 1021/bm500658w.
- [21] ZHANG Yanjie, CREMER P S. Chemistry of Hofmeister anions and osmolytes[J]. *Annu Rev Phys Chem*, 2010, 61(1): 63-83. DOI: 10. 1146/annurev. physchem. 59. 032607. 093635.
- [22] PARSONS D F, BOSTR M, LO N P, *et al.* Hofmeister effects: Interplay of hydration, nonelectrostatic potentials, and ion size[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13(27): 12352-12367. DOI: 10. 1039/C1CP20538B.
- [23] CHO Y, ZHANG Yanjie, CHRISTENSEN T, *et al.* Effects of Hofmeister anions on the phase transition temperature of elastin-like polypeptides[J]. *J Phys Chem B*, 2008, 112(44): 13765-13771. DOI: 10. 1021/jp8062977.
- [24] 黄凯宗, 李晶晶, 李巍, 等. 类弹性蛋白多肽的从头设计、非色谱纯化及盐效应[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(4): 653-658. DOI: 10. 13345/j. cbj. 2011. 04. 009.
- [25] 葛慧华, 张光亚, 王士斌. 氨基酸对类弹性蛋白多肽产量的影响[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2013, 34(5): 542-546. DOI: 10. 11830/ISSN. 1000-5013. 2013. 05. 0542.