

融合蛋白接头的研究进展*

毛 芸,李红民

(西北大学 组织工程与再生医学实验室,陕西省生物技术重点实验室,
西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室,生命科学院,西安 710069)

摘 要: 蛋白质接头是指存在于含有 2 个或多个特定结构域的蛋白质分子中连接 2 个相邻结构域的短小氨基酸序列,对蛋白质的功能和稳定性有重要作用。利用蛋白质接头将 2 个或多个特定功能的结构域连接在一起用以构建双功能或多功能融合蛋白的技术在生物制品研制和抗体偶联药物制备等领域备受青睐。作为融合蛋白不可缺少的构成部分,蛋白接头在构建具有稳定生物活性的融合蛋白中扮演着重要的角色。根据结构和功能的不同可将蛋白质接头分为柔性接头、刚性接头和体内可降解接头 3 大类。现就蛋白质接头的发现、分类、功能及其在融合蛋白构建中的应用情况进行综述。

关键词: 融合蛋白;接头;分类;功能;应用

中图分类号: Q81

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1001-9731.2018.02.006

0 引 言

基因重组技术为创造性获得功能性蛋白提供了强大的技术支撑,通过该技术制备的各种重组蛋白在当前生物医药市场的销售利润中占 3 成以上。随着应用范围的扩大,构建具有单一生物活性的重组蛋白已经不能满足使用需求,如理想的生物材料分子既要能够形成立体网架为细胞生长提供支撑、粘附表面和代谢交换环境,同时能够为细胞增殖、分化和迁移提供有利条件。早期的融合蛋白是直接利用基因工程技术将 2 种蛋白的核酸序列进行嵌合^[1],但这种方法经常引起融合蛋白的错误折叠^[2]、蛋白表达量降低^[3]或生物活性受到影响^[4-5]。为克服上述问题,研究者借鉴天然蛋白中连接不同结构域的氨基酸序列设计出多种蛋白质接头,用于多结构域重组蛋白的构建。本文简要介绍近年来关于天然蛋白接头、人工合成的蛋白质接头的研究与应用情况。

1 天然蛋白接头

天然多结构域蛋白是通过接头将 2 个或多个功能结构域连接而成。接头不仅起连接作用,还可以保持结构域间的相互作用^[6]或保持生物活性^[7]等。天然蛋白接头的研究对设计合适的融合蛋白接头具有很大的指导作用和参考价值。

Argos^[8]与 George 等^[9]分别调研查了 51 种接头和 1 280 种接头来检测天然蛋白接头的特性,两项调查中研究的接头样本量大小不同,接头的平均长度、氨基酸组成、疏水性和二级结构特性都存在明显差异。

Argos 研究的 51 种接头的平均长度为 6.5 个氨基酸残基,而 George 等研究的 1 280 种蛋白接头的平均长度是 (10.0 ± 5.8) 个氨基酸残基,之后又将这些接头细分为小型接头、中型接头和大型接头,平均长度分别为 (4.5 ± 0.7) 、 (9.1 ± 2.4) 和 (21 ± 7.6) 个氨基酸残基。Argos 的研究中,构成接头的氨基酸主要是 Thr、Ser、Pro、Gly、Asp、Lys 和 Gln 等,而 George 等的研究结果显示接头区域出现的氨基酸主要包含 Thr、Pro、Gln、Glu 和 Phe 等。Argos 发现接头的二级结构主要是无规卷曲和 β -转角,George 等发现接头的二级结构主要是 α -螺旋和无规卷曲。另外,George 等对接头的疏水性进行分析后发现随着接头长度的增加,其疏水性降低,这表明长的接头比短的接头亲水性更好。

接头最基本的功能是共价结合功能结构域或释放游离的功能结构域,除此之外,接头也可以在蛋白药物设计中提供更多新的功能,如提高生物活性、增加蛋白表达量、实现可控的或定向的药物递送,也可实现期望的融合蛋白药物代谢动力学。

2 接头的分类

根据结构和功能的不同,可将蛋白质接头分为柔性接头、刚性接头和体内可降解接头 3 大类^[10]。

2.1 柔性接头

柔性接头主要由分子量小的中性氨基酸(如 Gly、Ser)构成,可以使连接结构域之间有一定的摆动度和相互作用,柔性接头在融合蛋白设计中最为常用。

Huang 等^[11]以柔性氨基酸序列 GGGGS 和刚性氨基酸序列 EAAAK 为基本组成单元组合形成 10 种

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31670975);陕西省重点实验室科技计划资助项目(14JS088)

收到初稿日期:2017-07-20

收到修改稿日期:2017-10-20

通讯作者:李红民, E-mail:lihnm2006@nwu.edu.cn

作者简介:毛 芸 (1992—),女,甘肃庆阳人,在读硕士,主要从事生物材料制备与应用研究。

不同柔性的接头序列,接头柔性从(GGGGS)₅~(EAAAK)₅依次减弱,用这10种接头构建酸性磷酸酶绿色荧光蛋白(PhoC-GFP)融合蛋白的研究数据表明,插入不同柔性的接头可以改变PhoC-GFPs的柔性,使得磷酸转移酶活性和磷酸酶活性分别从19%和9.35%上升到100%。实验结果显示,接头(GGGGS)₃(EAAAK)₂能够使磷酸转移酶和磷酸酶的活性都达到最高,也能使GFP产生最大的荧光亮度。

刘丽等^[12]通过计算机模拟比较了SAPGTP和PG接头在白介素6-肿瘤坏死因子(IL6-SAPGTP-TNF)和(IL6-PG-TNF)融合蛋白构建中对IL-6和TNF空间结构的影响,并比较了融合蛋白IL6-SAPGTP-TNF和IL6-PG-TNF的生物活性。结果发现,IL6-SAPGTP-TNF表现出的生物活性是IL6-PG-TNF的2.7倍;IL6-SAPGTP-TNF抑瘤效率是IL6-PG-TNF的1.3倍,说明以SAPGTP为接头构建的IL6-SAPGTP-TNF融合蛋白优于以PG为接头构建的IL6-PG-TNF融合蛋白。

Gong Zifan等^[13]分别在GFP-NPFS D重组蛋白和GFP-pVEC重组蛋白中插入柔性G₄S接头,结果显示NPFS D-G₄S-GFP的表达量较NPFS D-GFP提高了24.5%;pVEC-G₄S-GFP的表达量较pVEC-GFP提高了50.0%,表明柔性接头G₄S可以有效改善融合蛋白的表达。

荧光素酶由一个大的N端结构域和一个小的C端结构域构成,2个结构域被荧光素酶分裂位点隔开。将2种柔性接头G₄S和(G₄S)₂分别插入到荧光素酶分裂位点的第416和第417个氨基酸残基之间来检测柔性接头对荧光素酶活性的影响。柔性接头的插入,将荧光素酶分裂成2个独立的突变酶。使用发光测定法检测突变酶和天然酶的酶学特性,结果表明,柔性接头的插入不会影响生物光的发射光谱,对酶的热稳定性也没有明显的影响。在荧光素酶分裂位点插入柔性接头能够使多肽链构象最大化自由,但不能使其稳定性和功能达到最佳^[14]。

2.2 刚性接头

柔性接头可以连接功能结构域并允许结构域之间有特定的摆动度,增加各个结构域独立折叠的可能性。但柔性接头缺乏刚性,会导致蛋白表达量降低或生物活性丧失,如用柔性接头(GGGGS)₃连接转铁蛋白(Tf)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)构建的融合蛋白Tf-(GGGGS)₃-G-CSF不能表达^[3],这可能是由于蛋白结构域之间没有充分分离或者结构域之间过度干扰。这种不足可以通过刚性接头而克服,刚性接头可以有效保持结构域之间的确定的距离并保持它们独立的功能。

EY-CBS是一个选择性与Cys反应的交联接头。研究中将人工合成的锚蛋白麦芽糖结合蛋白3~16的C端螺旋的第4个氨基酸和蛋白A的B4结构域N端

螺旋的第7个氨基突变为Cys,在2个螺旋之间加入EY-CBS交联接头形成融合蛋白来检测EY-CBS的作用。研究显示使用EY-CBS可以使融合螺旋结构保持原有结构,晶体结构表明在没有使用EY-CBS时,融合螺旋结构在融合位点有轻微的弯曲,而使用EY-CBS后,融合螺旋结构接近于原来的螺旋结构。在融合蛋白晶体结构的应用中,融合蛋白的刚性具有关键性的作用。EY-CBS可以作为探针检测2个螺旋结构是否真正融合且融合螺旋结构是否形成。这种方法可以连接蛋白结构域形成螺旋的结构,而且在构建满足各种需求的复杂的纳米组装方面非常有用^[15]。

使用刚性接头合成的二价配体可以预测趋化因子CXC家族受体CXCR4的二聚体形式,可用于癌细胞中的分子探针。研究中使用多聚Pro接头和聚乙二醇化的多聚Pro接头连接2个FC1 317类似物合成新型的CXCR4二价配体。在2个结构域间分别插入8种多聚Pro接头使2个配体间的距离维持在2~8 nm。不同长度的接头连接2个配体形成的二价配体能够决定CXCR4二聚体与配体的2个结合位点,使配体与GPCRS二聚体直接结合^[16]。

因为具有相对刚性的结构,刚性接头比柔性接头能更有效地分离功能结构域,改变拷贝数即可方便地调整接头长度,从而确定出结构域之间的最佳距离。

2.3 体内可降解接头

柔性接头和刚性接头是不能在体内降解的肽序列,这些稳定的接头将功能结构域共价结合在一起会延长融合蛋白在体内的血浆半衰期,但对于部分融合蛋白而言,接头的存在会使功能结构域之间互相干扰,改变融合蛋白的新陈代谢。

Chen等^[17]利用二硫键的可逆性设计的体内可降解的二硫键接头(LEAGCKNFFPR↓SFTSCGSLE),并用来连接粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和转铁蛋白(Tf)形成重组融合蛋白(G-S-S-T)。二硫键接头是一个在2个半胱氨酸(Cys)之间形成分子内二硫键的环肽,2个Cys之间有一段凝血酶敏感序列。在体内凝血酶的作用下,接头中凝血酶敏感序列被降解。实验通过对CF1小鼠静脉注射来证明二硫键连接的融合蛋白在体内可以降解。结果显示,注射G-S-S-T 5 min后血液中开始释放G-CSF,15 min时释放量达到最大,之后游离的G-CSF很快就消失,而注射没有接头的融合蛋白G-C-T后没有检测到游离的G-CSF。研究表明,连接融合蛋白的二硫化合物接头可实现对体内期望的蛋白结构域的分离。

Zhao等^[18]设计的体内可水解二硫环肽接头(CRRRRRREAEEAC)连接α2b干扰素(IFN-α2b)和人血清白蛋白(HSA)。接头中的2个Cys形成二硫键,2个Cys之间有一段对酵母分泌系统中的分泌信号蛋白酶敏感的肽序列。蛋白表达中,接头序列先被蛋白酶Kex2水解(CRRRRRR↓EAEEAC),然后被

蛋白酶 Kex1 和蛋白酶 Ste13 水解。结果发现,分泌物中出现 2 个 Cys 之间的氨基酸,且二硫环肽接头连接的融合蛋白能在酵母中表达。

3 蛋白接头的功能

3.1 改善融合蛋白的折叠和稳定性

“GS”接头用于抗体单链可变区(scFv)构建中抗体轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)的连接,可以改善融合蛋白的折叠和稳定性^[7]。Huston 等^[19]选用接头(GGGGS)₃构建 scFv,接头的柔性结构可以使轻链可变区与重链可变区以正确的方向融合而不影响蛋白结构域的折叠。

研究证明(Gly)₈可以提高融合蛋白的折叠和稳定性^[20],在 Myc 表位标签和 Est2p 蛋白之间插入(Gly)₈可以提高融合蛋白的功能,接头的插入能让 Myc 表位标签蛋白正确折叠,并能减少功能结构域之间的位阻。

Lu 等^[21]分别用 α 螺旋接头(EAAAK)₃ 和柔性接头(GGGGS)₂ 构建 β 葡聚糖酶和木聚糖酶双功能融合蛋白,结果发现使用 α 螺旋接头(EAAAK)₃ 构建的融合蛋白酶,其催化效率较野生型的 β 葡聚糖酶和木聚糖酶分别提高了 262% 和 31%,而以柔性接头(GGGGS)₂ 构建的融合蛋白酶,其催化效率比野生型的 β 葡聚糖酶和木聚糖酶分别提高了 326% 和 43%,表明接头的长度和结构也会影响融合蛋白的稳定性。

3.2 提高融合蛋白的表达量

结构域之间的相互干扰可能会导致融合蛋白折叠错误、稳定性差或出现多相产物,通常会导致融合蛋白表达量低^[2]。转铁蛋白(Tf)和人类生长激素(hGH)的融合实验中,选用(H4)₂ 接头以 2 种方向构建融合蛋白(Tf-(H4)₂-hGH)和(hGH-(H4)₂-Tf)并转染到 HEK293 细胞表达,根据表达量来检测 Tf 和 hGH 合适的融合方向。结果表明 hGH-(H4)₂-Tf 的表达量是 hGH-Tf 表达量的 1.66 倍,而 Tf-(H4)₂-hGH 的表达量是 Tf-hGH 表达量的 2.39 倍^[3]。说明融合蛋白接头对融合蛋白的表达量有一定影响作用,也揭示出在不改变接头的情况下,可以通过简单的调整融合结构域的上、下游位置而改善融合蛋白的表达效果。融合蛋白的表达有时候可以通过简单改变功能蛋白的方向来提高,但蛋白结构域之间的距离太近造成的干扰可能会降低蛋白表达量^[22]。因此,很多接头可以保持结构域之间合适的距离允许其独立折叠以达到提高融合蛋白表达量的目的。

3.3 提高融合蛋白的生物活性

融合蛋白设计的初衷是在一条多肽链中可以包含每个功能性结构的特定生物活性,但直接融合往往会影响融合蛋白的活性^[23],一方面功能结构域之间的距离太近时,结构难以独立折叠装配;另一方面,结构域之间的距离太近时,相邻结构域会影响各自与靶位点的结合,表现出生物活性降低或丧失的现象。接头的

使用可为功能结构域提供合适的距离以减少干扰、改善折叠或允许在体内释放游离的功能域,增加融合蛋白的生物活性。Weime^[24]的研究显示,在人类血清白蛋白(HSA)和干扰素 $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$)之间插入接头能够增加融合蛋白的生物活性和稳定性。白蛋白作为融合蛋白基底肽已被广泛使用于延长蛋白类药物的血浆半衰期,增强药物的治疗效果。

3.4 增加融合蛋白的靶向性

在融合蛋白接头中增加靶向序列,可以将融合蛋白靶向结合到体内特异性位点。应用带有靶向序列的可降解接头,不仅可以实现靶向,还可以在靶位点水解,向靶位点释放游离的活性蛋白结构域。使用多肽接头将抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)连接起来形成单链抗体(ScFv),通过单链抗体与肿瘤相关抗原的特异结合使药物靶向运输到达肿瘤部位,使肿瘤部位具有较高的药物浓度,这样不但可以提高抑瘤效果,还可以减少药物对正常组织的毒副作用^[25]。

3.5 影响融合蛋白类药物的代谢动力学

已有研究显示,蛋白接头可以影响融合蛋白类药物的代谢动力学(PK)。Chen 等^[26]研究发现,将 3 种接头分别插入转铁蛋白(Tf)和生长激素(GH)之间构建成融合蛋白 GH-LE-Tf, GH-(H4)₂-Tf 和 GH-cyclo-Tf,并检测其在小鼠体内的血浆半衰期,结果显示 3 种融合蛋白的血浆半衰期 GH-LE-Tf(4.97 h) > GH-(H4)₂-Tf(1.87 h) \approx GH-cyclo-Tf(1.76 h),都明显长于游离的 GH 血浆半衰期(<15 min),而 GH-LE-Tf 的血浆半衰期几乎是其它融合蛋白的 3 倍,说明接头的存在对蛋白的药物代谢动力学有一定影响。尽管已有多种融合蛋白应用于临床,但双功能或多功能融合蛋白药物的代谢动力学机制尚不清楚,稳定的适合融合蛋白类药物研究的代谢动力学模型还未建立。

4 融合蛋白接头的设计

天然多结构域蛋白和重组融合蛋白接头的广泛研究,需要合理的设计理想的融合蛋白特性的接头。生物大分子结构模拟和药物设计是生物信息学的研究内容和发展趋势中一个重要的方向^[27-28],如蛋白质空间结构模拟和分子设计,以及具有不同功能结构域的融合蛋白及结构域间连接肽的设计等。遗传算法是一种模拟自然界生物进化的算法,20 世纪 90 年代被引入计算机辅助药物分子的设计中,但因为速度太慢,人们对遗传算法进行了改进,使其具有更好的搜索功能、搜索效率和搜索性能^[29]。

Manion 等^[30]提出了一种用于构建金属有机骨架(MOF)的柔性有机接头的系统自动设计的方法。设计出的接头的柔性、顺应性或其它属性都源于接头自身,而不是来自框架运动学。

Li Gang^[31]等构建了一个可广泛控制融合蛋白柔性的接头库。接头的设计以柔性氨基酸序列(GGGGS)和刚性氨基酸序列(EAAAK)为基本单元,用混合匹配的方组合成5个基本单元形成32种完整接头。分子动力学(MD)模拟实验结果显示,接头中(EAAAK)序列越多,形成的螺旋结构和氢键越多,接头的N端和C端之间的距离变动越小。荧光共振能量转移(FRET)实验检测32种不同接头连接的蓝绿色荧光蛋白(CFP)和黄色荧光蛋白(YFP)融合蛋白融合蛋白CFP-YFP的柔性,结果显示,FRET效应在很大范围内出现,不同的接头插入导致CFP和YFP之间的距离的不同,插入柔性接头使CFP和YFP之间的距离相比插入刚性接头更小。耗散粒子动力学(DPD)模拟实验研究使用不同接头构建的融合蛋白CFP-YFP的柔性,与FRET实验结果一致。

Brian等^[32]描述了一种连接2个刚性蛋白结构域的螺旋接头设计程序。程序使用简单且适用于不同接头的设计程序的Rosetta软件。该软件的设计程序步骤和原则适于所有设计方法。Rosetta演示中包含该程序的整套输入和命令,Rosetta演示说明可在以下网站浏览 <https://www.rosettacommons.org/demos/latest/> 接头的设计中,通常需要考虑接头的长度、氨基酸组成以及接头的整体结构等。

4.1 接头长度

接头的长度对融合蛋白的影响深远。接头太长,融合蛋白容易被蛋白酶水解,使融合蛋白产量降低。较短的接头虽然可以克服蛋白酶分解的问题,但相邻功能结构域间相距太近会相互干扰,影响各自的折叠装配,导致蛋白功能丧失。

为了测定接头长度对融合蛋白生物催化效率的影响,Guo等^[33]将不同长度的2种接头肽(GSG)_n和(GGGGS)_n插入到拟南芥4-酰基辅酶A(4CL)和白藜芦醇二苯基乙醇合酶(STS)形成融合蛋白4CL-(GSG)_n-STS($n \leq 5$)和融合蛋白4CL-(GGGGS)_n-STS($n \leq 4$),在大肠杆菌中表达、纯化后测定其在活体和离体的生物活性。结果表明,融合蛋白的催化效率随着GSG和GGGGS的拷贝数的增加而降低,在酵母和大肠杆菌表达实验中,白藜芦醇的表达量随着接头长度的增加而降低。

Yang^[34]分析了接头长度对豹蛙抗瘤酶(ONC)和人血清白蛋白(HSA)融合蛋白在酵母中表达及生物活性的影响。设计出4种不同长度的柔性接头L₀、L₁(GGGGS)、L₂(GGGGS)₂和L₃(GGGGS)₃,构建融合蛋白HSA-(GGGGS)_n-ONC($n = 0, 1, 2$ 或3)在酵母中表达。利用DEAE弱阴离子层析法纯化蛋白,使用蛋白标记试剂盒B测定细胞毒性。结果显示,HAS-ONC对肿瘤细胞没有毒性,HAS-(GGGGS)-ONC和HAS-(GGGGS)₂-ONC对肿瘤细胞有微弱的毒性,而HAS-(GGGGS)₃-ONC可以杀死体内大量的肿瘤细

胞。说明融合蛋白的生物毒性随接头长度的增加逐渐增强。

4.2 接头中氨基酸组成

低电荷效应、低疏水性的氨基酸组成的多肽接头可以充分伸展以分开相邻蛋白结构域,使它们在互不干扰的情况下能够充分折叠成各自的天然构象。低电荷效应、低疏水性的氨基酸以Gly和Ser的应用最为广泛。Gly分子量最小,没有极性,位于融合蛋白结构域之间不会影响两侧蛋白的构象和功能,而且空间位阻也最小。Ser的亲水性较强,可以增加融合蛋白的亲水性。

Arai^[36]对螺旋式接头A(EAAAK)_nA所做的研究表明螺旋式接头可以更有效地分离融合蛋白的不同功能结构域,与相同长度的柔性接头相比,螺旋接头插入到增强的蓝色荧光蛋白(EBFP)和增强的绿色荧光蛋白(EGFP)融合蛋白之间显示出更弱的荧光共振能量转移(FRET)效应,这说明刚性接头可以更有效地分离功能结构域。

4.3 接头结构

接头中有出现太多的 α -螺旋和 β -折叠结构会限制融合蛋白的伸缩性,从而影响融合蛋白的功能活性,所以在设计蛋白接头时应尽量避免形成过多的二级结构^[37]。Xue等^[38]开发了一种叫LINKER的软件可以为构建融合蛋白设计接头序列,在输入参数后搜索序列数据库就能自动生成符合条件的几种接头序列,从中选出具有理想结构的接头序列。这个软件适于更范围的确定融合蛋白中的接头序列的结构。

5 结 语

研究者已经设计了很多融合蛋白接头并成功构建很多类型的双功能或多功能融合蛋白,这些蛋白接头包括柔性接头、刚性接头和体内可降解接头。接头可以为融合蛋白提供很多优点,如增加结构稳定性、增强生物活性、增加表达量或改变药物代谢动力学。目前融合蛋白构建中接头的合理设计缺乏强大的理论支持,接头设计依然处于初期。随着蛋白质科学技术的快速发展,人们对多功能融合蛋白的要求越来越高,融合蛋白接头的设计显得尤为重要。接头的插入将很大程度的促进药物靶向传递并应用于有稳定生物活性的重组融合蛋白的构建,所以,在后期的研究中,接头的合理设计、选择和优化是一个研究重点。

参考文献:

- [1] Yu Jian, Sarra S, Xu H M. Selection and application of linker peptide in the design of fusion protein[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 23(3): 260-263.
于 健, Sarra S, 徐寒梅. 连接肽在融合蛋白设计中的选择及应用[J]. 药物生物技术, 2016, 23(3): 260-263.
- [2] Zhao H L, Yao X Q, Xue C, et al. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin

- and interferon- α 2b fusion protein by linker engineering [J]. *Protein Expr Purif*, 2008, 61(1): 73-77.
- [3] Amet N, Lee H F, Shen W C. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins[J]. *Pharm Res*, 2009, 26(3): 523-528.
- [4] Bai Y, Ann D K, Shen W C, et al. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(20): 7292-7296.
- [5] Bai Y, Shen W C. Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(9): 2116-2121.
- [6] Gokhale R S, Khosla C. Role of linkers in communication between protein modules[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4(1): 22-27.
- [7] Hagemeyer C H, Von Z M C, Von E D, et al. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2009, 101(6): 1012-1019.
- [8] Argos P. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion[J]. *Mol Biol*, 1990, 211(4): 943-58.
- [9] George R A, Heringa J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding[J]. *Protein Engineering*, 2003, 15(11): 871-879.
- [10] Chen X, Zaro J L, Shen W C. Fusion protein linkers: property, design and functionality[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(10): 1357-1369.
- [11] Huang Ziliang, Li Gang, Zhang Chong. A study on the effects of linker flexibility on acid phosphatase PhoC-GFP fusion protein using a novel linker library[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 83: 1-6.
- [12] Liu Li, Xu Qi, Hu X M. wo 5'IL6-TNF α mutant fusion proteins with SAPGTP and PG linkers[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 15(4): 518-521 (in Chinese).
刘 丽, 徐 琪, 胡晓冥. SAPGTP 和 PG 为接头的 5' IL6-TNF α 衍生物融合蛋白[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(4): 518-521.
- [13] Gong Z, Walls M T, Karley A N, et al. Effect of a flexible linker on recombinant expression of cell-penetrating peptide fusion proteins and their translocation into fungal cells[J]. *Mol Biotechnol*, 2016, 58(12): 838-849.
- [14] Bahmani P, Hosseinkhani S. Increase of segmental mobility through insertion of a flexible linker in split point of firefly luciferase[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 94: 762-770.
- [15] Woo H J, Haerim L, Dong H S. Connecting two proteins using a fusion alpha helix stabilized by a chemical cross linker[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11031.
- [16] Tanaka T, Nomura W, Narumi T, et al. Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of the dimerization state in cells [J]. *Jacs Communication*, 2010, 132: 5899-5901.
- [17] Chen X, Bai Y, Zaro J. Design of an in vivo cleavable disulfide linker in recombinant fusion proteins[J]. *Biotechniques*, 2010, 49: 513-518.
- [18] Zhao H L, Xue C, Du J L, et al. Balancing the pharmacokinetics and pharmacodynamics of interferon- α 2b and human serum albumin fusion protein by proteolytic or reductive cleavage increases its in vivo therapeutic efficacy[J]. *Mol Pharm*, 2012, 9: 664-670.
- [19] Huston J S, Levinson D, Mudgett hunter M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 1988, 85: 5879-5883.
- [20] Sabourin M, Tuzon C T, Fisher TS, et al. A flexible protein linker improves the function of epitope-tagged proteins in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 2007, 24: 39-45.
- [21] Lu P, Feng M G. Bifunctional enhancement of a beta-glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(4): 579-87.
- [22] Zhao H L, Xue C, Wang Y, et al. Circumventing the heterogeneity and instability of human serum albumin-interferon- α 2b fusion protein by altering its orientation [J]. *Biotechnol*, 2007, 131(3): 245-52.
- [23] McCormick A L, Thomas M S, Heath A W. Immunization with an interferon-gamma-gp120 fusion protein induces enhanced immune responses to human immunodeficiency virus gp120 [J]. *Infect Dis*, 2001, 184(11): 1423-30.
- [24] Weimer T, Wormsbächer W, Kronthaler U, et al. Prolonged in-vivo half-life of factor VIIa by fusion to albumin[J]. *Thromb Haemost*, 2008(99): 659-677.
- [25] Hou Yanfang. The application of single chain variable fragment in the treatment of tumor [J]. *For all Health*, 2013, 7(12): 24-26 (in Chinese).
侯艳芳. 单链抗体及其在肿瘤治疗中的应用 [J]. *大家健康*, 2013, 7(12): 24-26.
- [26] Chen X, Lee H F, Zaro J L, et al. Effects of receptor binding on plasma half-life of bifunctional transferrin fusion proteins[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(2): 457-465.
- [27] Hajduk P J, Huth J R, Tse C. Predicting protein druggability[J]. *Drug Discovery Today*, 2005, 10(23-24): 1675-1682.
- [28] Tranchant I, Hervé A, Carlisle S, et al. Design and synthesis of ferrocene probe molecules for detection by electrochemical methods[J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17(5): 1256-1264.
- [29] Zhang Jianhua, Shang Zhigang, Zhang Xiaohui. The optimization design of fusion protein linker [J]. *Advances in Natural Science*, 2008, 18(7): 742-746 (in Chinese).
张建华, 尚志刚, 张晓晖. 融合蛋白链间连接肽的优化设计探讨 [J]. *自然科学进展*, 2008, 18(7): 742-746.
- [30] Manion C, Arlitt R, Campbell M T, et al. Automated design of flexible linkers [J]. *Dalton Trans*, 2016, 45(10): 4338-45.
- [31] Kuhlman B, Jacobs T, Linskey T. Computational design of protein linkers [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1414: 341-351.
- [32] Li Gang, Huang Ziliang, Zhang Chong. Construction of a

- linker library with widely controllable flexibility for fusion protein design[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 100(1): 215-225.
- [33] Guo H, Yang Y, Xue F, et al. Effect of flexible linker length on the activity of fusion protein 4-coumaroyl-CoA ligase: stilbene synthase[J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(3): 598-606.
- [34] Yang G G, Xu X Y, Ding Y. Linker length affects expression and bioactivity of the onconase fusion protein in *Pichia pastoris* Genet[J]. *Mol Res*, 2015, 14(4): 19360-19370.
- [35] Han Xiaoyan, Zhao Na, Gao Zhiyun. The immunological effect of DNA vaccine expressing fusion protein MDC-CVB3VP1 with different linker length[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2007, 27(12): 1145-1149(in Chinese).
- 韩小艳, 赵娜, 高志云, 等. 接头长度对 MDC 与 CVB3VP1 融合基因疫苗免疫效果的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(12): 1145-1149.
- [36] Arai R, Ueda H, Kitayama A, et al. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein[J]. *Protein Engineering*, 2001, 14: 529-532.
- [37] Liu Lian, Yu Yan. Technique and applications of fusion gene[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(2): 273-278(in Chinese).
- 刘涟, 于岩. 基因融合技术及其应用[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(2): 273-278.
- [38] Xue Fan, Gu Zhong, Feng Jinan. LINKER: a web server to generate peptide sequences with extended conformation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: 562-565.

Research progress of fusion protein linkers

MAO Yun, LI Hongmin

(Laboratory of Tissue Engineering and Regenerative Medicine,

Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The protein linker is a short amino acid sequence that exists in a protein molecule containing two or more specific domains, and plays an important role in the function and stability of the protein. The technology using protein linkers to construct bifunctional or multifunctional fusion protein has been widely used in the development of biological products, the preparation of antibody conjugated drugs and other areas such as popular. As an indispensable part of the fusion protein, protein linker has a key impact in the construction of fusion proteins with stable biological activity. According to the different structure and function, the protein linkers can be divided into flexible linkers, rigid linkers and in vivo cleavable linkers. In this paper, the discovery, species and function of fusion proteins linkers and the application in the construction of fusion protein in recent years were reviewed.

Key words: fusion protein; linkers; species; function; application

(上接第 02028 页)

Preparation and molecular dynamics simulation of PLA/PA11 blend

YANG Luxia¹, FU Yizheng², LIAO Liqiong³

(1. School of Information Business College of Shanxi University, Taiyuan 030031, China;

2. School of Materials Science and Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China;

3. Chongqing Changan Automobile Co., Ltd, Chongqing 400023, China)

Abstract: Blends of entirely biosourced polymers, namely polylactide (PLA) and polyamide11 (PA11), have been prepared by a melt-blending process. Several kinds of PLA/PA11 blends (with different ratio of 0/100, 10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 90/10, 100/0) were examined. DMA, XRD, SEM, mechanical properties testing, FT-IR analysis and molecular dynamics (MD) simulations were used to characterize the properties of the PLA/PA11 blends. The DMA analysis and MD simulation results showed that immiscibility prevails in all PLA/PA11 blends. XRD analysis indicated that in the 70/30 PLA/PA11 blends, the PLA component has been crystallized. SEM analysis indicated that there is a distinct interface between the PLA and PA11 in 70/30 PLA/PA11 blend, whose mechanical properties decrease significantly. The binding energy, radial distribution function $g(r)$ obtained from MD simulations results revealed the existence of hydrogen-bonding between PLA and PA11, but the compatibility of PLA/PA11 blends can not be improved by the weak hydrogen bonding.

Key words: PLA; PA11; blends; structure; molecular dynamics simulation