

连接肽的设计及在融合蛋白中的应用

李剑芳¹, 王春娟¹, 邬敏辰^{*2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用基因工程技术改造酶分子已成为现代分子酶工程的一个研究热点, 其中基于融合蛋白设计的融合酶技术已逐渐应用于多功能酶的构建中, 表现出了重要的理论与应用研究价值。作为重组融合蛋白不可缺少的部分, 连接肽已在融合蛋白的稳定性、生物活性等方面表现出重要的作用。根据近年来的最新研究成果, 作者总结了自然界中天然连接肽的性质, 并对糖苷水解酶融合酶中连接肽的分类及其对融合酶的作用作了归纳和总结, 并对连接肽设计的关键问题进行了探讨和展望。

关键词: 糖苷水解酶; 融合蛋白; 连接肽

中图分类号: Q 556+.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)11—1121—07

Design of Linker Peptides and Its Application in Fusion Protein

LI Jianfang¹, WANG Chunjuan¹, WU Minchen^{*2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: At present, the genetic engineering technology has become a hot research topic to modify enzyme molecule. Fusion enzyme technique based on the fusion protein design has been used in the construction of multi-functional enzymes and has shown the important potential application and theory values. As an indispensable component of recombinant fusion proteins, linker peptides have been shown to be important in the stability and bioactivity of fusion proteins. According to the latest research progress in recent years, the general properties of linkers derived from naturally-occurring multi-domain proteins, the classification and the advantageous of the linkers are summarized in this review. Finally, the key problems in the design of the linker and perspectives of this field were also discussed.

Keywords: glycoside hydrolase, fusion protein, linker peptide

糖苷酶又称糖苷水解酶, 是指一类能够催化糖苷键水解的酶^[1]。糖苷水解酶主要包括纤维素酶和

半纤维素酶; 纤维素酶分为外切纤维素酶、内切纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶等; 半纤维素酶主要包括甘露

收稿日期: 2015-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271811)。

作者简介: 李剑芳(1965—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物技术方面的研究。E-mail: lijf@163.com

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程方面的研究。

E-mail: bioch@163.com

聚糖酶和木聚糖酶等。糖苷水解酶在化工、饲料、食品、纺织、医药等众多工业领域中均有着广泛的应用^[2]。因此,研究者越来越倾向于通过分子改造获得更多优良性质的工程酶,基于融合蛋白设计的融合酶技术已经成为分子酶工程的研究热点^[3]。通过融合两个或多个蛋白域,融合蛋白产物可以从各个不同组成部分中获得不同的功能。

重组融合蛋白的构建需要两个因素:组成蛋白和连接肽。组成蛋白是根据所需融合蛋白产物的功能来进行选择的,在大多数情况下是相对简单的。而选择合适的连接肽却较困难,且在融合蛋白的设计过程中容易被忽略。若功能域不用连接肽直接进行融合会导致一些不良结果,如融合蛋白的错误折叠,产量低或者活性受损等。因此,连接肽的理性设计和选择对于融合蛋白的构建十分重要。作者总结了糖苷水解酶连接肽的最新进展,为进一步改造相关糖苷水解酶提供方法和依据,也为其它酶的改造提供参考。

1 天然连接肽的性质

与重组融合蛋白相似,天然融合蛋白也通过连接肽连接两个或多个功能域。这些连接肽可以连接蛋白模块^[4],也可以用来提供别的功能,如保持域间相互作用或者保持生物活性等^[5-7]。对天然多域蛋白中连接肽进行研究可以为重组融合蛋白中连接肽的设计提供参考。

George 等^[8]对 1 280 条天然连接肽进行了研究,对其长度、氨基酸偏好性及二级结构进行了总结。研究指出,连接肽平均长度为 10.0 ± 5.8 个氨基酸残基,并根据连接肽的长度将其分为大型连接肽(残基数: 21 ± 7.6)、中型连接肽(残基数: 9.1 ± 2.4)、小型连接肽(残基数: 4.5 ± 0.7)。在天然糖苷水解酶中,连接肽的长度变化很大,一般为 6~59 个氨基酸残基^[9-13]。此外,George 等通过计算,发现脯氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺更易倾向于形成连接肽。其中,脯氨酸是出现频率最高的氨基酸,很有可能是因为其环状侧链上酰胺氢的缺失阻止了其与其它氨基酸的形成氢键,从而降低了连接肽与别的蛋白域的相互作用。因此,脯氨酸的存在可以增加连接肽的刚性和结构独立性。在一些天然糖苷水解酶中连接肽也常有脯氨酸的存在,如在甘露聚糖酶催化结构域与碳水化合物结合域(CBM)之

间的连接肽(TTTPPPVSSTTTTSSRTSSTPPPPGGSCTQLYGQ)^[10],木聚糖酶催化结构域与 CBM 之间的连接肽(PPLAIEKDIPSL)^[12]。Couturier 等^[14]研究的一个真菌内切甘露聚糖酶 PaMan26A 中一段连接肽(PRPPHDINPNLN),脯氨酸占其总长的 1/3。

天然连接肽采用多种构象的二级结构,如 α -螺旋、 β -折叠股、卷曲状、转角状等。在 George 等^[8]的研究中,38.3%的天然连接肽采用 α -螺旋二级结构,37.6%连接肽采用 β -折叠股构象,采用卷曲状和转角状的比例分别为 13.6%和 8.4%。采用 α -螺旋二级结构的连接肽可以作为刚性隔板而有效地隔离蛋白域,从而减少它们之间的不良相互作用。如果连接肽没有固定的刚性结构,非螺旋状连接肽就会趋向于富含脯氨酸而增加其刚性,减少域间的相互作用。

2 连接肽的设计与构建

2.1 连接肽的分子设计原理

构建融合蛋白时,必须保证当融合蛋白形成正确的构象后,各种蛋白还应该保持原有的活性。因此设计的连接肽应保证以下两个条件:1)各个功能蛋白的多肽链不应相互影响,也不应相互折叠或缠绕在一起而导致彼此的活性丧失;2)各个功能蛋白的活性中心要相互远离,这样不会形成空间位阻而影响了活性的表现^[15]。此外,设计连接肽时,也应充分考虑蛋白质的表达、纯化、复性效率等要求^[16]。一般认为,连接肽能够把两个结构域进行适当地隔开,进而在反应过程中可以避免不同结构域的互相干扰,所以引入连接肽可以实现融合酶的成功表达^[3]。

2.2 设计连接肽的工具与数据库

近年来,随着对自然多域蛋白和重组融合蛋白连接肽研究的不断深入,连接肽数据库的想法随之提出,同时,连接肽设计工具也被不断完善,来帮助以融合蛋白特性为基础的连接肽的理性设计。

Crasto 等^[17]设计出了一种计算机程序:LINKER。根据设计的连接肽序列长度及设计者的指定要求,输入参数,就可以自动产生一系列符合标准的连接肽序列。连接肽数据库的建立是基于这样的假设:在 X-射线晶体结构或 NMR 溶液结构中所观察到的循环序列,很有可能会在融合蛋白中采用一种扩展构象作为连接肽^[18]。该程序是专门设计

用来帮助构造融合蛋白,并且设计者已经合并了许多可选的输入参数,以方便使用者对于特异性序列的选择。这个程序在生物技术产业和生物医学研究领域将会是一个非常有用的工具,可以通过如下网站进行(<http://www.fccc.edu/research/labs/feng/linker.html>)。

另一种基于 Web 的程序也提供了一种包含连接肽的数据库并提供了搜索引擎(<http://www.ibi.vu.nl/programs/linkerdbwww/>)。搜索算法有着几种查询类型,如:PDB 代码、PDB 数据头、连接肽长度、溶剂可及性和二级结构或序列等。这个程序不仅可以提供连接肽序列以满足搜索标准,还可以提供其它信息如 PDB 代码、源蛋白的简要说明、源蛋白中连接肽的位置、长度、溶剂可及性和二级结构。使用者可以搜索具有所需性质的序列,从天然多域蛋白中获得候选序列。

2.3 连接肽的构建

目前构建融合蛋白的连接肽主要有两种来源:一种是天然多域蛋白之间的连接序列,一般没有经过特别的设计。如唐存多等^[9]将来源于里氏木霉纤维二糖水解酶的 CBM 融合至 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 上,其连接肽即为里氏木霉纤维二糖水解酶中天然存在的;另一类是专门设计的连接肽,有两类构建方法:1) 通过适当的限制性内切酶酶切位点将两个基因相融合,如 α -淀粉酶基因与不同来源寡肽的连接^[20];2) 采用重叠延伸 PCR 技术,融合两个基因。如张献伟等^[21]根据 Lu 等人研究结果和在线软件 LINKER,筛选出 6 条 α -螺旋连接肽和柔性连接肽,将甘露聚糖酶基因与木聚糖酶基因进行融合。

2.4 连接肽的分类

目前,在天然多域蛋白中已发现许多连接肽,并用于构建融合蛋白。此外,研究者也已经设计出大量具有不同序列和结构的连接肽用于重组融合蛋白的构建,根据连接肽的功能,主要分为三类:柔性连接肽、刚性连接肽和体内可裂解连接肽。

2.4.1 柔性连接肽 当连接的功能域之间需要一定的相互作用,可以使用柔性连接肽。它们一般由小的非极性氨基酸(如甘氨酸)或者极性氨基酸(如丝氨酸或苏氨酸)组成。小的氨基酸更能提供柔性,使得连接的功能域不互相干扰从而更好地发挥其作用。而极性氨基酸如丝氨酸和苏氨酸可以与水分

子形成氢键,因此可以保证连接肽在水溶液中的稳定性同时减少连接肽与蛋白区域的不良反应。虽然柔性连接肽并没有刚性结构,但它可以作为一个被动的连接肽来保持功能域之间的距离。此外,也可以调整柔性连接肽的长度以使融合蛋白达到最好的生物活性。目前,最常用的人工设计的柔性连接肽主要是由甘氨酸和丝氨酸残基伸展组成(GS 连接肽),最典型的一个例子就是由 Huston 等人提出的 $(GGGGS)_n$ (一般 $n \leq 6$) 序列^[22],通过调整重复数 n ,优化 GS 连接肽的长度使得功能域适当分开或者保持域间的作用,这几乎已经成为一种“通用连接肽”。如陆平等^[23]设计了 7 条柔性连接肽 $(GGGGS)_n$ ($n = 1 \sim 3$),将 β -葡聚糖酶与木聚糖酶进行融合,结果显示,其中有 3 条连接肽连接的融合酶表现出双功能活性。

在糖苷水解酶融合酶中,一般多为柔性连接肽,来自于 *Aspergillus nidulans* XZ3 的基因 man5XZ3,其编码的一个含有 CBM1 的多域甘露聚糖酶,连接肽即为富含丝氨酸和苏氨酸的柔性连接肽^[24];从 *Trichoderma harzianum* MGQ2 中克隆表达出的甘露聚糖酶 ThMan5A,其连接肽也为富含丝氨酸和苏氨酸的柔性连接肽^[10]。尽管柔性连接肽在连接功能域时具有很多的优势,但由于其缺乏一定的刚性,它的使用还是受到了一定的限制。一些文献报道,由于柔性连接肽的使用而导致了低的表达量或者生物活性的丧失。

2.4.2 刚性连接肽 刚性连接肽是由容易形成稳定的二级结构的氨基酸残基组成,在很多情况下,由于其能够形成较稳定的二级结构,所以它比柔性连接肽更能有效地将功能域分开并保持它们的独立的功能。当功能域分离的空间对于融合蛋白的稳定性和生物活性至关重要时,就可以选择使用刚性连接肽。

George 等^[8]研究认为许多天然的刚性连接肽形成 α 螺旋结构。一般在重组融合蛋白中最常使用的刚性 α 螺旋连接肽为 $(EAAAK)_n$ ($n \leq 6$)。由于其内部存在氢键且有着紧密的骨架,所以 α 螺旋结构是刚性的并且是稳定的。Minsup 等^[25]分别用柔性连接肽(GGGGS)和刚性连接肽(EAAAK)连接两个分别来源于白星花金龟和甜菜夜蛾的抗微生物蛋白,经实验证明,相比于亲本蛋白,用刚性连接肽连接的融合蛋白的抗菌活性得到很大的提高,而用柔性

连接肽连接的融合蛋白却未表现出如此效果,表明刚性连接肽可以有效分离功能域,从而使得融合蛋白得到高于亲本蛋白的活性。Guo 等^[26]分别用柔性连接肽 $(GGGGS)_n$ ($n=1\sim3$)和刚性连接肽 $(EAAAK)_n$ ($n=1\sim3$)连接木聚糖酶和甘露聚糖酶,经比较,用刚性连接肽连接的融合酶表现出更好的热稳定性。Arai 等^[27]首先根据经验设计了刚性连接肽序列 A $(EAAAK)_n$ A ($n=2\sim5$),此连接肽有着 α 螺旋构象,且它是由片段之间的谷氨酸-赖氨酸盐桥来稳定的。Guo 等^[26]将连接肽用于甘露聚糖酶和木聚糖酶的融合,结果表明,融合酶表现出双功能酶活性,并且随着连接肽的长度增加,融合酶的催化效率不断提高,而当重复次数达到 4 次时,催化效率又开始下降,这暗示着可以通过改变 EAAAK 的重复次数来控制结构域之间的距离。

另一种刚性连接肽类型是富含脯氨酸的序列 $(XP)_n$,X 可以设计为任意一种氨基酸,而 George 等^[8]认为 X 最好是丙氨酸,赖氨酸,或者是谷氨酸。在非螺旋刚性连接肽中,脯氨酸的存在可以增加刚性,并且可以使得蛋白域有效地分离。研究显示,富含脯氨酸的连接肽 $(XP)_n$ 经常被用作连接肽的另外一个原因是,其已经被证实具有明显的抗蛋白酶降解性,并且在许多天然多结构域蛋白中作为连接肽^[28-29],如在很多天然的纤维素酶和木聚糖酶中, $(PT)_n$ P 就是作为连接肽连接催化域与 CBM,并且已经证明其对纤维素和木聚糖的降解有着重要的作用。Kavoosi 等^[29]也在 CBM-GFP 融合体系中比较了常见的 $(GGGGS)_n$ 、 $(PT)_n$ P 和通过计算机辅助设计的 S_3N_{10} 等连接肽的连接效果,结果发现,在连接肽 $(GGGGS)_n$ 上有不少位点被蛋白酶切割,而 $(PT)_n$ P 和 S_3N_{10} 均有着很好的抗蛋白酶的降解作用。

2.4.3 体内可裂解连接肽 体内可裂解的连接肽多用于生物制药中,一般不用于融合酶的构建。前面所讨论的连接肽,在生物体内均不会被优先降解。这些稳定的共价连接肽将功能域连接在一起作为一整个分子,在生物制药中表现出很多优点,如延长血浆的半衰期等。但它们也有着一些潜在的缺点,包括功能域之间的位阻,生物活性的降低,生物分布的改变及由于结构域之间的干扰而导致的蛋白质代谢的改变等。在这种情况下,可以引入可裂解连接肽以释放出游离功能域。此类型连接肽可以减少空间位阻,提高生物活性,并在连接肽裂解后

实现各个功能域的新陈代谢。

在体内过程中,一种被充分研究的方法是二硫键的还原,这已经通过化学共价的方法被广泛应用于药物的传送。利用二硫键的可逆性质,Chen 等^[30]设计了一种重组融合蛋白在体内可裂解的二硫化物连接肽,以保证释放出的活性域进入到血液循环。经实验验证,这种连接肽可以适用于多种重组融合蛋白,使得其在体内分离出功能域来提高医药治疗效果,并得到所希望的功能性结构域的药代动力学特征和生物分布。最近,Zhao 等^[31]设计了一种类似于环肽的连接肽,这是一种在干扰素- $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$)和人血清白蛋白(HAS)融合蛋白中的体内可裂解的二硫化物连接肽。这个连接肽序列在两个半胱氨酸残基之间含有一个分子内二硫键以及一个对酵母分泌途径中的分泌信号敏感的肽序列。结果表明,在分泌过程中,连接肽中两个半胱氨酸残基之间的氨基酸被完全去除,并且二硫键相连的融合蛋白可以直接在毕赤酵母中表达。

2.5 连接肽的功能

在重组融合蛋白中,连接肽最基本的功能是将功能域共价连接(如柔性连接肽和刚性肽)或者是在期望的条件下将功能域释放(如可裂解连接肽)。除以上基本功能外,连接肽也提供了许多派生功能,比如提高生物活性、增加产量等。

2.5.1 提高融合蛋白的折叠及稳定性 连接肽可以提高二级结构的稳定性并在保持二级结构的完整性中发挥重要的作用,同时也可以提高催化结构的稳定性。柔性连接肽在几种融合蛋白的例子已经被证明可以提高折叠性与稳定性。如将刚性连接肽 $(EAAAK)_n$ ($n=1\sim3$)与柔性连接肽 $(GGGGS)_n$ ($n=1\sim3$)应用到 β -葡聚糖酶和木聚糖酶的双功能融合酶的构建中,在插入连接肽之后,所得到的融合蛋白的稳定性和催化活性得到显著的改善^[32]。Lu 等^[24]从 *Aspergillus nidulans* XZ3 中克隆并表达了含有 CBM1 的甘露聚糖酶 Man5XZ3,将连接肽截掉并重新表达后发现,酶的热稳定性变差。Li 等^[33]发现去掉连接肽,木聚糖酶 xynAS27 的温度稳定性及 pH 稳定性均变差。

2.5.2 提高融合蛋白的表达量 由于蛋白质结构域之间结构的扰动,融合蛋白可能会被错误地折叠,从而导致低的表达量。而连接肽可以使得两个域之间保持适当的距离并且允许它们独立地折叠,

因此,它可以作为一个合适的工具来提高重组融合蛋白的表达量。Amet 等^[34]将螺旋连接肽(H_4)₂插入到以转铁蛋白(Tf)为基础的融合蛋白中,结果表明,连接有连接肽的融合蛋白比没有连接肽的融合蛋白的表达量提高了数倍。

2.5.3 提高融合蛋白的生物活性 通常通过融合两个及以上的蛋白结构,融合蛋白可以得到来自各个组成部分的生物活性。然而,可能是由于功能性结构域太接近会与它们相应的结合蛋白相互作用会导致融合蛋白的生物活性受损,因此在这种情况下,可以选择在融合蛋白之间插入连接肽,在结构域之间提供适当的距离来减少干扰,提高折叠或者是在体内释放出游离的功能域从而提高生物活性。陆平等^[23]验证,没有连接肽的 β -葡聚糖酶-木聚糖酶融合酶生物活性丧失,而在插入连接肽之后,融合酶表现出了双功能活性。Jin 等^[35]将葡聚糖酶 Cel5Z 与木聚糖酶 XynX 融合时发现,当将 Cel5Z 与 XynX 不用连接肽融合时,融合酶不显示双功能酶活性;而将 Cel5Z 与 XynX 用富含丝氨酸和苏氨酸的连接肽连接时,融合酶则显示出双功能活性。也有研究显示,随着不同结构域之间连接肽长度的缩短,融合酶的活性也会相应减少,这说明,连接肽会影响结构域是否能形成有活性的构象^[36]。

3 展望

与天然酶相比,融合酶的构建无论在功能上还是应用上都有着众多的优势,同时,连接肽的引入在一定程度上也可以解决蛋白质不能正确表达、蛋白质不稳定、酶活性受损甚至丧失等问题。尽管在过去一段时间里,研究者已经设计了各种不同类型的连接肽,但对于其的理性设计还停留在初期阶段。在多域蛋白设计的过程中,由于各个结构域需要形成有活性的空间构象,合适的连接肽是影响结构域折叠的重要因素,所以需要充分考虑连接肽的类型、长度及融合的顺序等。后续研究需要解决以下两个关键问题:1) 需要设计能不同程度、不同方面改变结构域空间组织关系的连接肽的种类,为连接肽的理性设计提供更丰富的模板;2) 需要对不同连接肽(如组成、结构、长度)对结构域的空间组织关系的影响进行研究。可以通过 X-射线晶体学和 NMR 技术对连接肽进行更深入的结构剖析,从而可以推动连接肽的理性设计及其科学的应用。随着蛋白质科学和生物技术的飞速发展,融合蛋白连接肽的设计显得尤为重要,只有透彻地了解它们的结构、构象与功能,连接肽的引入才能极大地提高重组融合蛋白的稳定与生物活性,从而可以对其进行更好地应用。

参考文献:

- [1] 郁惠蕾,许建和,林国强. 糖苷水解酶在糖苷合成中的应用概况[J]. 有机化学,2006,26(8):1052-1058.
YU Huilei, XU Jianhe, LIN Guoqiang. Application of glycosidase to glycoside synthesis[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2006, 26(8): 1052-1058. (in Chinese)
- [2] 刘琼. *Bispora antennata* 来源的三个糖苷水解酶基因的克隆与表达[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
- [3] 黄子亮,张翀,吴希,等. 融合酶的设计和应用研究进展[J]. 生物工程学报,2012,28(4):393-409.
HUANG Ziliang, ZHANG Chong, WU Xi, et al. Recent progress in fusion enzyme design and applications [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(4): 393-409. (in Chinese)
- [4] Gokhale R S, Khosla C. Role of linkers in communication between protein modules[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4(1): 22-27.
- [5] Chong P A, Lin H, Wrana J L, et al. Coupling of tandem Smad ubiquitination regulatory factor (Smurf) WW domains modulates target specificity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18404-18409.
- [6] Shastry S, Hancock W O. Neck linker length determines the degree of processivity in kinesin-1 and kinesin-2 motors[J]. *Current Biology*, 2010, 20(10): 939-943.
- [7] Yuzawa S, Kapur S, Cane D E, et al. Role of a conserved arginine residue in linkers between the ketosynthase and acyltransferase domains of multimodular polyketide synthases[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(18): 3708-3710.
- [8] 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.

- [9] Takasuka T E, Acheson J F, Bianchetti C M, et al. Biochemical properties and atomic resolution structure of a proteolytically processed β -Mannanase from Cellulolytic *Streptomyces* sp. SirexAA-E[J]. **PLoS One**, 2014, 9(4): e94166.
- [10] Wang J, Zeng D, Liu G, et al. Truncation of a mannanase from *Trichoderma harzianum* improves its enzymatic properties and expression efficiency in *Trichoderma reesei*[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2014, 41(1): 125-133.
- [11] Pham T A, Berrin J G, Record E, et al. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: Role of a carbohydrate-binding module [J]. **Journal of Biotechnology**, 2010, 148(4): 163-170.
- [12] Song H Y, Lim H K, Kim D R, et al. A new bi-modular endo- β -1,4-xylanase KRICT PX-3 from whole genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2014, 54: 1-7.
- [13] Black G W, Hazlewood G P, Xue G P, et al. Xylanase-B from *Nrocallimastix patriciarum* contains a non-catalytic 455-residue linker sequence comprised of 57 repeats of an octapeptide[J]. **Biochemical Journal**, 1994, 299: 381-387.
- [14] Couturier M, Feliu J, Bozonnet S, et al. Molecular engineering of fungal GH5 and GH26 beta- (1,4)-mannanases toward improvement of enzyme activity[J]. **PLOS One**, 2013, 8(11): e79800.
- [15] 闫璐颖, 陈建华, 张新国. 融合蛋白连接肽的研究进展[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4): 92-94.
YAN Luying, CHEN Jianhua, ZHANG Xinguo. Research progress in the linker of fusion protein[J]. **Biotechnology**, 2000, 16(4): 92-94. (in Chinese)
- [16] 刘志刚, 俞炜源, 王翔. 两种人源化单链抗体-尿激酶融合基因的构建与表达[J]. 生物技术, 2008, 13(2): 514-516.
LIU Zhigang, YU Weiyuan, WANG Xiang. The construction and expression of two humanized scFv-urokinase fusion genes[J]. **Biotechnology**, 2008, 13(2): 514-516. (in Chinese)
- [17] Crasto C J, Feng J. Linker: a program to generate linker sequences for fusion proteins [J]. **Protein Engineering**, 2000, 13(5): 309-312.
- [18] Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features [J]. **Biopolymers**, 1983, 22(12): 2577-2637.
- [19] Tang C D, Li J F, Wei X H, et al. Fusing a carbohydrate-binding module into the *Aspergillus usamii* β -mannanase to improve its thermostability and cellulose-binding capacity by in silico design[J]. **PLOS One**, 2013, 8(5): e64766.
- [20] Yang H Q, Lu X Y, Liu L, et al. Fusion of an oligopeptide to the N terminus of an alkaline α -amylase from *Alkalimonas amylolytica* simultaneously improves the enzyme's catalytic efficiency, thermal stability, and resistance to oxidation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013, 79(9): 3049-3058.
- [21] 张献伟, 张冠冠, 吴珍芳, 等. 木聚糖酶-甘露聚糖酶融合酶基因 Linker 优化及其在猪肾 pK15 细胞中共表达[J]. 中国农业科学, 2013, 46(22): 4774-4783.
ZHANG Xianwei, ZHANG Guanguan, WU Zhenfang, et al. Peptide linkers optimized recombinant enzyme gene of XynB-ManA and its co-expression in pK15 cells[J]. **Scientia Agricultura Sinica**, 2013, 46(22): 4774-4783. (in Chinese)
- [22] 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]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1988, 85(16): 5879-5883.
- [23] 陆平. 双功能 β -葡聚糖酶-木聚糖酶与 β -葡聚糖酶-植酸酶融合酶的优化构建及其酶学特性分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [24] Lu H Q, Luo H Y, Shi P J, et al. A novel thermophilic endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3: functional roles of carbohydrate-binding module and Thr/Ser-rich linker region [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(5): 2155-2163.
- [25] Lee M, Bang K, Kwon H, et al. Enhanced antibacterial activity of an attacin-coleopteracin hybrid protein fused with a helical linker[J]. **Molecular Biology Reports**, 2013, 40(6): 3953-3960.
- [26] Guo N, Zheng J, Wu L, et al. Engineered bifunctional enzymes of endo-1,4- β -xylanase/endo-1,4- β -mannanase were constructed for synergistically hydrolyzing hemicellulose[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2013, 97: 311-318.
- [27] Arai R, Wriggers W, Nishikawa Y, et al. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering[J]. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 2004, 57(4): 829-838.
- [28] Wriggers W, Chakravarty S, Jennings P A. Control of protein functional dynamics by peptide linkers [J]. **Biopolymers**, 2005, 80

- (6):736-746.
- [29] Kavoori M, Creagh A L, Kilburn D G, et al. Strategy for selecting and characterizing linker peptides for CBM9-tagged fusion proteins expressed in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2007, 98(3):599-610.
- [30] Chen X Y, Bai Y, Zaro J L, et al. Design of an in vivo cleavable disulfide linker in recombinant fusion proteins [J]. **Biotechniques**, 2010, 49(1):513-518.
- [31] 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]. **Molecular Pharmaceutics**, 2012, 9(3):664-670.
- [32] Lu P, Feng M G. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 79(4):579-587.
- [33] Li N, Shi P J, Yang P L, et al. A xylanase with high pH stability from *Streptomyces* sp. S27 and its carbohydrate-binding module with/without linker-region-truncated versions[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2009, 83(1):99-107.
- [34] Amet N, Lee H F, Shen W C. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins[J]. **Pharmaceutical Research**, 2009, 26(3):523-528.
- [35] An J M, Kim Y K, Lim W J, et al. Evaluation of a novel bifunctional xylanase-cellulase constructed by gene fusion [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005, 36(7):989-995.
- [36] Lu P, Feng M G, Li W F, et al. Construction and characterization of a bifunctional fusion enzyme of *Bacillus*-sourced β -glucanase and xylanase expressed in *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2006, 261(2):224-230.

会 议 信 息

会议名称(中文): 2015 上海辰山“药食同源与植物代谢”国际学术研讨会

开始日期: 2015-12-13

结束日期: 2015-12-14

所在城市: 上海市 黄浦区

具体地点: 上海辰山植物园

主办单位: 中国植物生理与植物分子生物学学会

承办单位: 上海辰山植物园

联系人: 杨舒婷

联系电话: 021-37792288-922

E-MAIL: shootingy@163.com

会议网站: http://www.cspp.cn/cp9-1_more.asp?id=1519

会议背景介绍: 为了展示国内外在药食同源与植物代谢方面的最新研究进展与未来发展方向, 及探讨新兴生命科学技术对该研究领域的影响, 我们拟定于 2015 年 12 月 13 日下午至 13 日上午在上海辰山植物园召开 2015 上海辰山“药食同源与植物代谢”国际学术研讨会, 以促进科研人员的交流与合作。本次会议由中国植物生理与分子生物学学会与上海市资源植物功能基因组重点实验室联合承办。会议将邀请多位国内外相关领域的专家作大会主题报告, 交流最新学术成果, 欢迎广大同行及研究生报名参加。

会议主题: 功能食品与植物天然产物, 植物代谢与调控, 植物营养与基因组学