

• 生物技术与方法 •

# 蛋白质自组装条件筛选形成的透明液滴中存在的自组装现象

张托弟, 邓旭东, 赵风珠, 史文璞, 陈亮亮, 周雅青, 王雪霏, 张辰艳, 尹大川

西北工业大学生命学院 空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 陕西 西安 710072

张托弟, 邓旭东, 赵风珠, 等. 蛋白质自组装条件筛选形成的透明液滴中存在的自组装现象. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1396-1405.

Zhang TD, Deng XD, Zhao FZ, et al. Self-assembly in the transparent droplets formed during the screening of protein self-assembly conditions. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1396-1405.

**摘要:** 微-纳尺度的蛋白质自组装体具有形貌多样性与良好的生物相容性, 因而成为蛋白质自组装领域的研究热点。以蛋白质结晶条件的筛选手段高通量筛选不同类型蛋白质于不同尺度、不同形貌的自组装过程, 是一种新兴的研究方法, 具有重要研究意义。利用该方法进行蛋白质自组装条件筛选时, 常会形成一些表观透明的液滴, 其中是否有自组装现象的发生尚不明确。文中以  $\beta$ -乳球蛋白与蛋白质结晶试剂盒 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用为例进行探索, 实验结果表明透明液滴中存在微-纳尺度的蛋白质自组装体。进一步通过扫描电镜观察不同初始浓度  $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 混合形成的透明液滴中微-纳自组装体的形貌有所差别; 通过激光共聚焦显微镜连续拍摄添加荧光标签的  $\beta$ -乳球蛋白形成自组装体的过程, 可实时观察到液液相分离现象及最终形成的自组装体的形貌; 通过原位 X-射线衍射手段, 可观察到自组装体内部结构随时间推移逐渐有序化的过程。以上研究表明, 在以结晶条件筛选手段为基础的蛋白质自组装条件筛选实验中, 透明液滴内的自组装现象具有深入探索的必要和价值。

**关键词:** 透明液滴, 微-纳组装体,  $\beta$ -乳球蛋白, Index<sup>TM</sup> C10

**Received:** August 5, 2020; **Accepted:** October 28, 2020

**Supported by:** Innovation Capability Support Program of Shaanxi Province, China (No. 2020TD-042), Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (2019JM-581), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21805229, U1632126), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2019T120948), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 3102019ghxm017).

**Corresponding author:** Dachuan Yin. Tel/Fax: +86-29-88460254; Email: yindc@nwpu.edu.cn

陕西省创新能力支撑计划 (No. 2020TD-042), 陕西省自然科学基金基础研究计划 (No. 2019JM-581), 国家自然科学基金 (Nos. 21805229, U1632126), 中国博士后科学基金 (No. 2019T120948), 中央高校基本科研业务费 (No. 3102019ghxm017) 资助。

网络出版时间: 2020-11-09

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201106.1616.005.html>

# Self-assembly in the transparent droplets formed during the screening of protein self-assembly conditions

Tuodi Zhang, Xudong Deng, Fengzhu Zhao, Wenpu Shi, Liangliang Chen, Yaqing Zhou, Xueting Wang, Chenyan Zhang, and Dachuan Yin

Key Laboratory for Space Bioscience & Biotechnology, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, Shaanxi, China

**Abstract:** Protein self-assemblies at the micro- and nano-scale are of great interest because of their morphological diversity and good biocompatibility. High-throughput screening of protein self-assembly at different scales and morphologies using protein crystallization screening conditions is an emerging method. When using this method to screen protein self-assembly conditions, some apparently transparent droplets are often observed, in which it is not clear whether self-assembly occurs. We explored the interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and the protein crystallization kit Index<sup>TM</sup> C10 and observed the presence of micro- and nano-scale protein self-assemblies in the transparent droplets. The diverse morphology of the micro- and nano-scale self-assemblies in the transparent droplets formed by mixing different initial concentrations of  $\beta$ -lactoglobulin and Index<sup>TM</sup> C10 was further investigated by scanning electron microscope. Self-assembly process of fluorescence-labelled  $\beta$ -lactoglobulin was monitored continuously by laser confocal microscope, allowing real-time observation of the liquid-liquid phase separation phenomenon and the morphology of the final self-assemblies. The internal structure of the self-assemblies was gradually ordered over time by *in-situ* X-ray diffraction. This indicates that the self-assembly phenomenon within transparent droplets, observed in protein self-assembly condition screening experiments, is worthy of further in-depth exploration.

**Keywords:** clear droplets, micro- and nano-scale protein assembly,  $\beta$ -lactoglobulin, Index<sup>TM</sup> C10

蛋白质是绝大多数生命存在的基础,也是生命活动的主要载体,参与机体几乎所有的生理功能,而生物体内蛋白质大多是通过自组装或是与其他大分子、小分子之间的组装来发挥主要作用<sup>[1]</sup>。组装体因其精确的结构和多样性的功能为生命体正常运行发挥了无可替代的作用,如核酸、蛋白质等生物大分子的自组装及核糖体、线粒体、p 颗粒等无膜细胞器的形成<sup>[2-4]</sup>。结构正确有序的组装体可以保障机体的正常运转,为生命体执行相关的生物学功能,如 DNA 钳子辅助 DNA 聚合酶持续催化 DNA 复制<sup>[5]</sup>、肌动蛋白维持细胞骨架及促进肌肉收缩<sup>[6]</sup>,而错误的组装体则会引发机体的病变,蛋白质错误组装聚集成类淀粉样纤维是导致各种神经性相关疾病的主要原因,如: A $\beta$ 1-40/42 引起的阿尔兹海默症<sup>[7-8]</sup>、 $\alpha$ -突触核蛋白引起的帕金森症<sup>[9]</sup>、hIAPP1-37 引起的 II 型糖尿病<sup>[10]</sup>等。因此,研究蛋白质组装体对探索蛋白质

结构与功能的内在联系具有重要意义。

目前体外蛋白质自组装研究手段主要有直观设计、模板化设计、计算机设计等<sup>[11]</sup>,这些方法在一定程度上均为体外研究蛋白质组装体的形成提供了极大的便利。笔者实验室前期已经成功实现了利用蛋白质结晶试剂盒筛选的方法,发展了高通量、广谱的筛选不同蛋白质组装体的技术<sup>[12]</sup>。同时,在实验研究中也发现与蛋白质结晶筛选类似,在组装体筛选过程中也会有很多透明液滴形成。微-纳尺度的组装体因其多功能性及尺寸优势和蛋白质的天然来源、易降解、可回收、良好的生物相容性等优势,在新型材料领域具有日益广阔的应用潜力,也是当前研究的热点之一<sup>[13]</sup>。因此,本研究旨在探寻组装体筛选过程中形成的透明液滴中是否存在微-纳尺度组装体,这具有重要的意义。

$\beta$ -乳球蛋白是一种球状蛋白<sup>[14]</sup>,主要存在于

牛奶中,也是一种脂质运载蛋白,是乳清的主要成分,作为食品蛋白具有很高的营养价值。 $\beta$ -乳球蛋白由 162 个氨基酸残基组成,分子量为 18.3 kDa,等电点为 5.1–5.3,然而当温度大于 70 °C 且低于临界凝胶浓度时, $\beta$ -乳球蛋白会聚集形成具有周期性的左手螺旋类淀粉样纤维<sup>[15]</sup>。由此,当前对  $\beta$ -乳球蛋白自组装体的研究主要集中在高温和低 pH 对形成淀粉样纤维的影响上,而对于其他形貌的  $\beta$ -乳球蛋白自组装体的研究鲜有报道。

基于笔者实验室对蛋白质结晶筛选技术已具有较为成熟的研究基础,且依托前期已经成功通过蛋白质结晶筛选技术实现了不同类型的蛋白质自组装体的高通量筛选,发现不同蛋白质在不同试剂盒筛选中均存在孵育数天后依然保持澄清透明状的液滴的现象。因此,本研究以  $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 在体式显微镜下观察形成透明液滴为例,进一步探索透明液滴中是否存在微-纳组装体。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

仪器:体式显微镜 (Olympus SZX 16, 日本),扫描电子显微镜 (Nano SEM 450, FEI 公司),结晶板 (HR3-267, 美国汉普顿研究公司),恒温循环水浴箱 (Polyscience 9712; Polyscience Co., 美国),结晶密封胶带 (HR4-506, 美国汉普顿研究公司),X-射线衍射仪 (Mar  $\mu$ X, Mar Research, 德国),自动移液系统 (Screen 96+8 Xtal, 美国),真空干燥机 (精宏 SZF-6210),电子天平 (BS-134S, 赛多利斯)。

试剂: $\beta$ -乳球蛋白 (L0130, 90%) 购自 Sigma 公司,PEG 2000 MME (CAS:9004-74-4) 和 Hepes Na 缓冲液购自上海麦克林生化科技有限公司,丁二酸 (AR) 购自天津市科密欧化学试剂有限公司,进口 PES 滤膜聚醚砜水系滤器 (0.22  $\mu$ m) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。上述所有样品不需要进一步纯化,均可直接使用,本实验中所用的水均为去离子水 (18.2 M $\Omega$ )。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 制备 $\beta$ -乳球蛋白组装体

$\beta$ -乳球蛋白粉末溶于去离子水中,配制成 10 mg/mL 蛋白质溶液;将 1% (W/V) PEG MME 2 000, 1 mol/L 丁二酸定容至 100 mL 预先配制的 0.1 mmol/L 的 HEPEs Na 缓冲液 (pH 7.0) 中作为 Index<sup>TM</sup> C10 沉淀剂。将预先配制好的蛋白质溶液、沉淀剂溶液通过 0.22  $\mu$ m 水相滤器过滤后按 1:1 体积混合,以 2  $\mu$ L 体系分散在结晶板中,结晶胶带密封后置于 20 °C 控温箱孵育<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.2 表征 $\beta$ -乳球蛋白组装体

本实验通过体式显微镜、扫描电镜 (SEM) 及激光共聚焦显微镜 (LSCM) 观察形成的  $\beta$ -乳球蛋白组装体形貌,并在室温环境下 (25 °C) 通过原位 X-射线衍射手段观察  $\beta$ -乳球蛋白组装体在溶液条件下形成组装体过程中内部结构的变化。

1) 分别制备原体系 (混合前  $\beta$ -乳球蛋白浓度为 10 mg/mL)、稀释 100 倍体系 (混合前  $\beta$ -乳球蛋白浓度为 100  $\mu$ g/mL) 以及稀释 10 000 倍体系 (混合前  $\beta$ -乳球蛋白浓度为 1  $\mu$ g/mL) 的蛋白质溶液与稀释同样倍数的沉淀剂混合后置于 20 °C 控温箱中孵育 1 周,体式显微镜观察结晶板中溶液的直观状态,每日拍照记录。

2) 分别取上述各混合体系中 5  $\mu$ L 溶液至洁净的硅片表面,真空干燥 (2 h),喷金 (90 s),作为扫描电镜样品。

3) 利用激光共聚焦显微镜实时原位可视化观察透明液滴中组装体的形成过程。通过在  $\beta$ -乳球蛋白表面修饰荧光标签 f1<sup>[17]</sup>,荧光分子 f1 接枝到乳球蛋白表面的过程如图 1 所示,图 1 中乳球蛋白结构引自于 PDB: 5IO6,其中荧光标签 f1 的激发波长为 521 nm,发射波长为 534 nm。

4) 利用单晶 X-射线衍射技术,采用本实验室设计的“三明治”样品架,原位实时观察室温条件下  $\beta$ -乳球蛋白在 Index<sup>TM</sup> C10 下形成组装体过程中的内部结构变化。“三明治”样品架结构示意图如图 2 所示,“三明治”样品架所用材料为 1 mm 有机玻璃、5  $\mu$ m 聚酰亚胺膜和 3 M 胶带。

## 2 结果与分析

将连续孵育数天的透明液滴通过扫描电镜观察获得了不同浓度、不同形貌的 $\beta$ -乳球蛋白组装体；利用激光共聚焦显微镜实时原位捕获了 $\beta$ -乳球蛋白组装体形成过程中的液液相分离现象及添加荧光标签 f1 后形成的组装体的形貌；利用原位 X 射线衍射技术对组装体形成过程中的结构变化进行实时追踪。以上实验手段都为理解 $\beta$ -乳球蛋白体外自组装体的形成过程提供了指导。

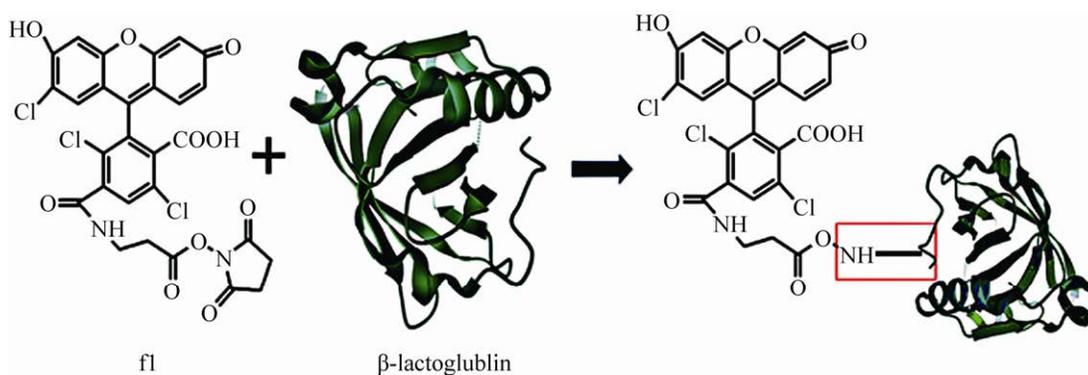


图 1 荧光分子 f1 接枝到乳球蛋白表面的过程示意图

Fig. 1 Diagram showing the process of grafting fluorescent molecule f1 to the surface of  $\beta$ -lactoglobulin.

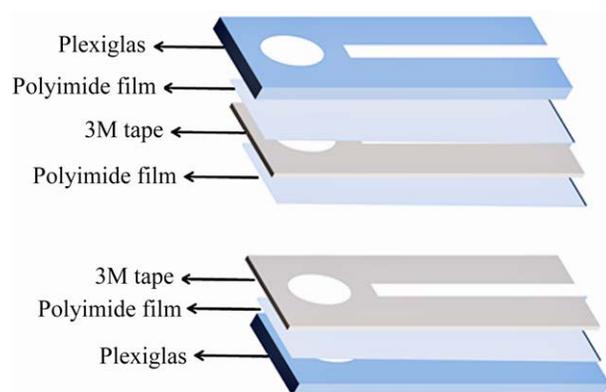


图 2 本实验室设计的室温衍射“三明治”样品架结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the room temperature diffraction “sandwich” sample holder designed by our group.

### 2.1 体式显微镜下的透明液滴

在体式显微镜下观察到的 10 mg/mL  $\beta$ -乳球蛋白与对应 Index<sup>TM</sup> C10 沉淀剂相互作用形成的溶液照片如图 3 所示。结果显示，在 20 °C 控温箱中经过一周的孵育，混合溶液依然呈现澄清透明状。

### 2.2 扫描电镜观察微-纳尺度的 $\beta$ -乳球蛋白的组装体

基于上述体式显微镜下观察到  $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用后形成了透明液滴，进一步

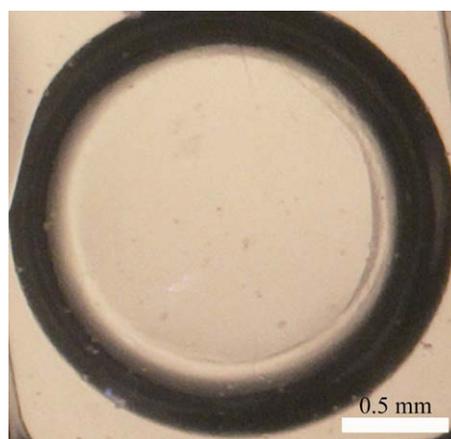


图 3 在 20 °C 孵育 1 周后的  $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 混合液

Fig. 3 Optical microscope result of  $\beta$ -lactoglobulin and Index<sup>TM</sup> C10 mixture incubation at 20 °C for one week.

猜想蛋白质自组装体筛选中出现的透明液滴中是否会存在微-纳尺度的组装体。实验配制不同浓度的 $\beta$ -乳球蛋白与对应浓度的 Index<sup>TM</sup> C10, 按照 1:1 体积混合, 形成 2  $\mu$ L 体系, 在 20  $^{\circ}$ C 控温箱中孵育一周, 利用 SEM 观察涂覆在硅片表面的 $\beta$ -乳球蛋白组装体的形貌, 得到了不同浓度的 $\beta$ -乳球蛋白形成的形貌各异的微-纳尺度组装体, 如图 4A-C 所示。

图 4A 是 10 mg/mL  $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用形成的组装体形貌, 由图可观察到, 形成了一个由棒状单元堆积而成的 $\beta$ -乳球蛋白组装体, 其由直径约为 30 nm 的棒状单元堆积成尺寸约为 1  $\mu$ m 的聚集体。同时, 在该组装体附近存在大量分散的还未参与组装的不同尺度的颗粒状单体及小棒状组装体 (约为 50 nm)。图 4B 是 100  $\mu$ g/mL  $\beta$ -乳球蛋白与对应浓度的 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用形成的组装体形貌, 如图展示了一个尺寸约为 770  $\mu$ m 的组装体, 在干燥过程中会促使组装体之间发生抱团聚集现象, 由此堆积形成了尺寸较大的组装体。由图可知, 具有形貌统一、核心尺寸约为 700 nm、四周携带长度约为 2  $\mu$ m 刺突的海胆状组装体为该组装体的组装单元。图 4C 是 1  $\mu$ g/mL  $\beta$ -乳球蛋白与稀释 1 000 倍 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用形成的具有蠕虫状结构的组装体形貌, 如图所示, 形成了不同长度的有序结构的蠕虫状组装体, 单个蠕虫状组装体尺寸均在 10  $\mu$ m

内。图 4 是不同浓度的 $\beta$ -乳球蛋白与对应浓度的 Index<sup>TM</sup> C10 组中获得的组装体形貌, 由图可见不同组装浓度下组装体之间形貌差异较大, 可能是由于在不同溶液浓度下, 蛋白质分子与蛋白质分子之间相互作用发生了改变。在一定溶液浓度范围内, 蛋白质分子与蛋白质分子之间的作用方式是确定的, 此时, 形成的组装体形貌之间有一定的类似性; 而当溶液浓度过大或过小时, 溶液环境会改变蛋白质分子之间相互作用的关系, 可能导致蛋白质分子间表面的电荷分布更有利于蛋白质分子之间紧密的相互作用, 或蛋白质分子之间由于静电斥力, 始终会保持一定距离而不会发生聚集, 因而组装成形貌差异较大的组装体。由此可见, 通过探索不同浓度的组装体形貌, 发现蛋白质和沉淀剂浓度对形成的组装形貌具有较大的影响。

### 2.3 激光共聚焦显微镜下的液液相分离现象

据文献报道“非纤维化蛋白质组装体的形成都伴随着液液相分离的发生”<sup>[18]</sup>。因此, 为了探寻体式显微镜下透明液滴形成微-纳尺度组装体时是否伴随相分离的发生, 我们将荧光小分子 f1 通过酰胺键与 $\beta$ -乳球蛋白连接, 利用激光共聚焦显微镜原位观察 100  $\mu$ g/mL  $\beta$ -乳球蛋白在对应浓度的 Index<sup>TM</sup> C10 (稀释 100 倍) 条件下自组装的过程。结果如图 5 所示, 在 63 $\times$ 油镜下可明显观察到的 $\beta$ -乳球蛋白发生液液相分离的过程, 每隔



图 4 不同浓度的 $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用形成的乳球蛋白组装体扫描电镜结果

Fig. 4 Scanning electron microscopy results of different concentrations of  $\beta$ -lactoglobulin interacting with Index<sup>TM</sup> C10. (A) The morphology of the assembly formed by the interaction between 10 mg/mL  $\beta$ -lactoglobulin and original Index<sup>TM</sup> C10. (B) The morphology of the assembly formed by the interaction between 100  $\mu$ g/mL  $\beta$ -lactoglobulin and corresponding Index<sup>TM</sup> C10. (C) The morphology of the assembly formed by the interaction between 1  $\mu$ g/mL  $\beta$ -lactoglobulin and corresponding Index<sup>TM</sup> C10.

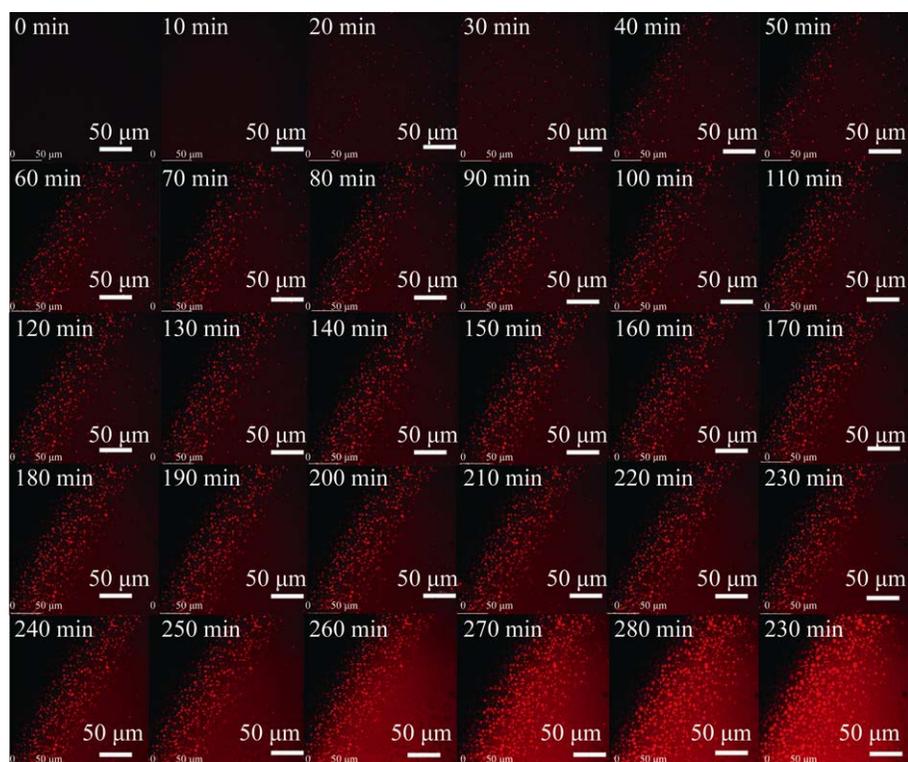


图 5 接枝荧光标签 f1 的  $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用过程中的液液相分离现象

Fig. 5 Liquid-liquid phase separation phenomenon of the interaction between fluorescent f1 labelled  $\beta$ -lactoglobulin with Index<sup>TM</sup> C10.

10 min 原位拍照记录。由图 5 可以看出 0 min 时， $\beta$ -乳球蛋白分子在溶液中呈均匀分布，溶液中荧光强度很弱，溶液基本呈现一片黑色。随着溶液中浓度和结构的起伏， $\beta$ -乳球蛋白分子之间聚集形成了具有明显尺寸的浓液相，且聚集形成的浓液相呈现出较明显的荧光信号，在 30 min 时可明显观察到浓液相之间发生融合，体系中存在微米尺度的球状聚集体。随着时间增加，聚集体之间发生融合形成尺寸更大的球状浓液相，荧光强度呈现明显增强趋势。在 290 min 时，溶液中大部分尺寸较小的浓液相融合形成浓度较为均匀的稳定浓液相，体系呈现趋于一致的明亮荧光，且稀液相中由于蛋白质浓度的增加，也呈现出越来越明显的荧光亮度。此时， $\beta$ -乳球蛋白组装体形成过程中的液液相分离阶段基本结束。图 6 所示为图 5 中乳球蛋白在液液相分离过程连续观察至

320 min 时，通过 63 $\times$ 油镜观察不同位置形成的组装体形貌。图 6A 呈现多孔状的乳球蛋白组装体，图 6B 展示的组装形貌与图 4B 中 100  $\mu$ g/mL  $\beta$ -乳球蛋白扫描电镜下观察到的形貌基本一

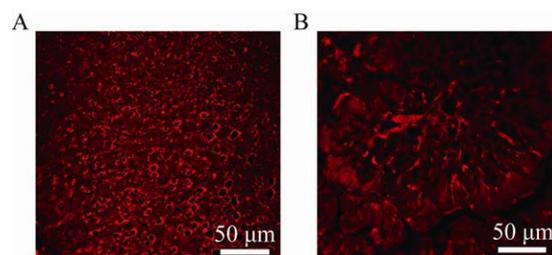


图 6 接枝荧光标签 f1 的  $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用形成的组装体的形貌

Fig. 6 Morphology of the assembly formed by the interaction between fluorescent f1 labelled  $\beta$ -lactoglobulin with Index<sup>TM</sup> C10. (A) Porous  $\beta$ -lactoglobulin assembly observed under a 63X oil lens (320 min). (B) Umbrella-like  $\beta$ -lactoglobulin assembly observed under a 63X oil lens (320 min).

致。综上，激光共聚焦下观察的 $\beta$ -乳球蛋白的组装形貌与扫描电镜观察的结果不完全一致，可能是在激光共聚焦进行原位观察乳球蛋白自组装过程中，由于组装溶液所处环境温度与控温箱温度不同，从而造成组装形貌有所差异。

#### 2.4 X-射线衍射技术实时原位观察组装过程

X-射线衍射技术通常被用于解析蛋白质单晶结构，且蛋白质晶体是一种特殊的蛋白质自组装体<sup>[1]</sup>。通常，单晶衍射获得的衍射图谱会出现整齐的独立的衍射点信息，衍射点的出现表明已有尺寸较大的晶体出现，而当溶液中出现较多具有同一面间距的小晶体或从无序结构到有序结构的转变态时，衍射图谱会出现连续的衍射圆环或是不同面间距的衍射环段信息。因此，我们借助X-射线衍射手段，原位实时观察了处于不同时刻液滴中 10 mg/mL  $\beta$ -乳球蛋白在 Index<sup>TM</sup> C10 条件下自组装过程中组装体内部结构变化，将混合后同浓度的 $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 作为对照组。如图 7 所示， $\beta$ -乳球蛋白组随着时间变化衍射图谱中信息并未发生明显改变(图 7 第 1 组)，未出现弥散的衍射环或单独的衍射环及单独的衍射点，即蛋白溶液随着时间变化，并不能仅仅依靠蛋白质分子间的热运动而组装形成有序的结构。Index<sup>TM</sup> C10 组溶液随着时间变化(图 7 第 2 组)，衍射图谱中信息出现了明显变化，从起初的无序到出现

弥散的衍射环及随着时间的增加出现了明显的衍射点，说明液体在挥发过程中析出了沉淀剂中的丁二酸及 PEG 2 000 MME，并形成了具有不同面间距的盐晶聚集体。 $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 混合溶液组随着时间变化过程中衍射图谱出现了从无衍射信息到出现明显的衍射点的变化(图 7 第 3 组)，对应于同时刻的 Index<sup>TM</sup> C10 组，形成了衍射图谱并不同，在 7 h 时，混合体系中已经出现明显的衍射点的信息，而 Index<sup>TM</sup> C10 组中并未有任何衍射点出现，说明此时第 3 组中已经有有序结构的形成，随着时间的增加，第 3 组中获得的衍射信息明显多于第 2 组中多晶的衍射信息，且通过与标准 PDF 卡片对照，排除了第 3 组中盐晶的衍射信息，依然存在不同晶面间距的衍射信息，由此推断，第 3 组中的 $\beta$ -乳球蛋白发生了自组装且形成了有序的组装结构。因此图中出现的衍射信息为 $\beta$ -乳球蛋白在不同时刻形成的组装体的结构。由此可见，随着时间变化，混合溶液中 $\beta$ -乳球蛋白发生了自组装且随着时间的增加，形成的组装体在热力学和动力学作用下进一步形成更稳定的组装形貌(衍射图谱呈现出有弥散的衍射环到独立的衍射点的变化)。图 8 展示的是未加样品的“三明治”样品架聚酰亚胺膜自身的衍射图谱，聚酰亚胺膜自身在 4.05–5.51 Å 范围内有弥散的衍射环。

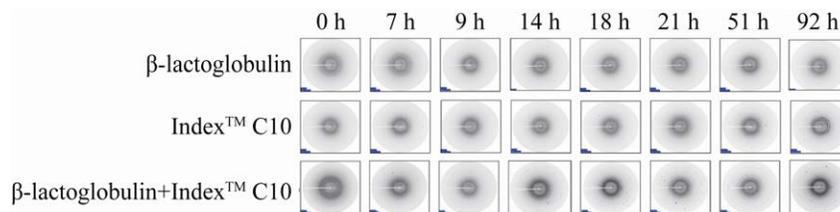


图 7 室温实时原位衍射图谱(第 1 行为纯 $\beta$ -乳球蛋白组随着时间变化的衍射图谱，第 2 行为纯 Index<sup>TM</sup> C10 组随时间变化的衍射图谱，第 3 行为 10 mg/mL  $\beta$ -乳球蛋白与 Index<sup>TM</sup> C10 相互作用组的衍射图谱)

Fig. 7 Real-time *in-situ* diffraction pattern detected at room temperature. The first line is the diffraction pattern of the pure  $\beta$ -lactoglobulin group changed over time, the second line is the diffraction pattern of the pure Index<sup>TM</sup> C10 group with time, and the third line is the diffraction pattern of the  $\beta$ -lactoglobulin and Index<sup>TM</sup> C10 interaction group changed over time.

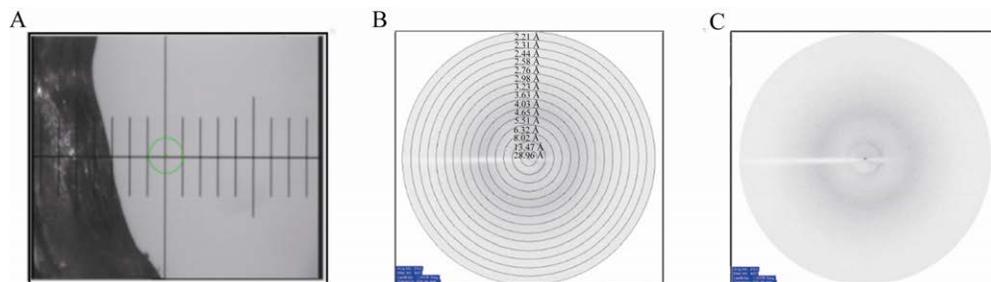


图 8 “三明治”样品架聚酰亚胺膜的衍射图谱

Fig. 8 Diffraction pattern of the “sandwich” polyimide film. (A) The polyimide film positioned by the diffraction spot. (B) The diffraction background of the polyimide film with resolution rings. (C) The diffraction background of the film without resolution rings.

### 3 讨论

#### 3.1 透明液滴中微-纳组装体的探索

在蛋白质自组装筛选中，通常主要关注具有有序形貌的组装体的形成条件，而忽略了无规则组装体及透明液滴溶液，本实验通过对自组装筛选过程中出现的透明液滴的进一步深入探索，发现微-纳尺度的组装体可能存在于透明液滴中。因此，对于蛋白质自组装领域的学者而言，为了获得微-纳尺度的组装体，通常应该在利用蛋白质结晶筛选技术筛选组装体时，关注筛选获得的透明液滴中是否存在微-纳尺度的组装体。

#### 3.2 单晶 X-射线衍射技术的拓展

目前单晶 X-射线衍射技术通常被用来解析蛋白质晶体的结构<sup>[19]</sup>。而成功获得的脱氧核糖核酸 (DNA 双螺旋结构) 的衍射图谱<sup>[20]</sup>以及蛋白质二级结构  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠<sup>[21]</sup>的衍射图谱为 X-射线单晶衍射拓展了新的用途，我们猜想是否可以通过利用单晶 X-射线衍射技术获得的图谱解析更多的结构信息呢？相比于常规的 XRD 粉末衍射谱，X-射线衍射获得的二维衍射图谱更有助于清楚地认识组装体的空间结构及组装基元的空间位置，同时在本实验中，通过利用原位实时衍射技术，可以清晰地捕获处于不同时刻的组装体的内部结构信息。为此，单晶 X-射线衍射技术将有望作为一种在接近生理状态下 (可控温度、溶液

环境) 获得体内各种有序组装体形成过程的研究手段，为深入探索机体的复杂组装体的形成提供更有利的新技术途径。

#### 3.3 微-纳尺度组装体的潜在应用

蛋白质分级自组装形成具有不同结构和功能的组装体，是生命活动中必不可少的组成物质。蛋白质自组装材料相比于其他材料，由于其天然来源以及良好的生物相容性、易于控制形成的组装形貌等优势，被视为一种具有广泛应用前景的微-纳尺度材料。Zou 等通过将肽类与其他小分子相互用组装构建成仿生光合体系，体外模拟了光合作用的过程及作用机制<sup>[22]</sup>，Xi 等通过引入其他小分子，将多肽类与药物小分子利用光热效应很好地作用于肿瘤的治疗中<sup>[23]</sup>。Gu 等利用 TCEP 打开溶菌酶二硫键组装成可在任何规则或不规则基底表面成膜的超级材料。他们通过结合金纳米粒子形成智能抗菌材料<sup>[24]</sup>、Zhao 等在维生素 C 作用下制备成避免二次创伤的伤口敷料<sup>[25]</sup>，作为矿化模板<sup>[26]</sup>等广泛应用于各个领域<sup>[27]</sup>。Zhao 等、Shen 等通过将乳球蛋白组装的纤维制备成水凝胶、气凝胶、膜等材料，应用于污水处理<sup>[28]</sup>、新型食品添加剂等<sup>[29]</sup>。由此可见，蛋白质通过自身组装及与其他分子组装形成结构和功能更优越的组装体，蛋白质组装体作为新型生物材料具有广阔的研究价值和应用前景。如已经通过组装手段实现的人工肌肉<sup>[30]</sup>以及人工贝壳<sup>[31]</sup>等。

## REFERENCES

- [1] Bai YS, Luo Q, Liu JQ. Protein self-assembly via supramolecular strategies. *Chem Soc Rev*, 2016, 45(10): 2756-2767.
- [2] Banani SF, Lee HO, Hyman AA, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-298.
- [3] Carloni LE, Bezzu CG, Bonifazi D. Patterning porous networks through self-assembly of programmed biomacromolecules. *Chem A Eur J*, 2019, 25(71): 16179-16200.
- [4] Feng Z, Chen XD, Wu XD, et al. Formation of biological condensates via phase separation: Characteristics, analytical methods, and physiological implications. *J Biol Chem*, 2019, 294(40): 14823-14835.
- [5] van Dongen SFM, Elemans JAAW, Rowan AE, et al. Processive catalysis. *Angewand Chem Int Ed*, 2014, 53(43): 11420-11428.
- [6] Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys*, 2011, 40: 169-186.
- [7] Cai XJ, Zhang K, Xie X, et al. Self-assembly hollow manganese Prussian white nanocapsules attenuate Tau-related neuropathology and cognitive decline. *Biomaterials*, 2020, 231: 119678.
- [8] Wallin C, Jarvet J, Biverstål H, et al. Metal ion coordination delays amyloid- $\beta$  peptide self-assembly by forming an aggregation-inert complex. *J Biol Chem*, 2020, 295(21): 7224-7234.
- [9] Yang WW, Li XR, Yin N. Increased  $\alpha$ -synuclein oligomerization is associated with decreased activity of glucocerebrosidase in the aging human striatum and hippocampus. *Neurosci Lett*, 2020, 733: 135093.
- [10] Cannon D, Eichhorn SJ, Donald AM. Structure of spherulites in insulin,  $\beta$ -lactoglobulin, and amyloid  $\beta$ . *ACS Omega*, 2016, 1(5): 915-922.
- [11] Wilson CJ, Bommarium AS, Champion JA, et al. Biomolecular assemblies: moving from observation to predictive design. *Chem Rev*, 2018, 118(24): 11519-11574.
- [12] 尹大川, 张托弟, 王雪霆, 等. 利用试剂盒配方筛选蛋白质自组装条件的方法: CN109870472A. 2019-06-11.
- [13] Yin DC, Zhang TD, Wang XT, et al. Searching for conditions of protein self-assembly by protein crystallization screening method: CN109870472A. 2019-06-11 (in Chinese).
- [14] Yadav S, Sharma AK, Kumar P. Nanoscale self-assembly for therapeutic delivery. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 127.
- [15] Dave AC, Loveday SM, Anema SG, et al. Glycation as a tool to probe the mechanism of  $\beta$ -lactoglobulin nanofibril self-assembly. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(14): 3269-3278.
- [16] Lara C, Adamcik J, Jordens S, et al. General self-assembly mechanism converting hydrolyzed globular proteins into giant multistranded amyloid ribbons. *Biomacromolecules*, 2011, 12(5): 1868-1875.
- [17] Chen RQ, Yin DC, Liu YM, et al. Promoting protein crystallization using a plate with simple geometry. *Acta Crystallograph Sect D Struct Biol*, 2014, 70(3): 647-657.
- [18] Wu XL, Tian M, Fan WT, et al. Synthesis, spectroscopic properties, and biological applications of eight novel chlorinated fluorescent proteins-labeling probes. *J Fluoresc*, 2014, 24(3): 775-786.
- [19] Dong H. Editorial to the special issue—'recent advances in self-assembled peptides'. *Molecules*, 2019, 24(17): 3089.
- [20] 张辰艳, 尹大川, 鹿芹芹, 等. 蛋白质结晶条件筛选策略研究进展. *材料导报*, 2010, 24(5): 22-28.
- [21] Zhang CY, Yin DC, Lu QQ, et al. Research progresses in screening strategies of protein crystallization. *Mater Rev*, 2010, 24(5): 22-28 (in Chinese).
- [22] Latychevskaia T, Fink HW. Three-dimensional double helical DNA structure directly revealed from its X-ray fiber diffraction pattern by iterative phase retrieval. *Opt Expr*, 2018, 26(23): 30991-31017.
- [23] Pizzi A, Dichiarante V, Terraneo G, et al. Crystallographic insights into the self-assembly of KLVFF amyloid-beta peptides. *Peptide Sci*, 2018, 110(5): e23088.
- [24] Zou QL, Chang R, Xing RR, et al. Injectable self-assembled bola-dipeptide hydrogels for sustained photodynamic prodrug delivery and

- enhanced tumor therapy. *J Control Release*, 2020, 319: 344-351.
- [23] Xi DM, Xiao M, Cao JF, et al. NIR Light-driving barrier-free group rotation in nanoparticles with an 88.3% photothermal conversion efficiency for photothermal therapy. *Adv Mater*, 2020, 32(11): 1907855.
- [24] Gu J, Su YJ, Liu P, et al. An environmentally benign antimicrobial coating based on a protein supramolecular assembly. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(1): 198-210.
- [25] Zhao J, Qu YC, Chen H, et al. Self-assembled proteinaceous wound dressings attenuate secondary trauma and improve wound healing *in vivo*. *J Mater Chem B*, 2018, 6(28): 4645-4655.
- [26] Ha Y, Yang J, Tao F, et al. Phase-transited lysozyme as a universal route to bioactive hydroxyapatite crystalline film. *Adv Funct Mater*, 2018, 28(4): 1704476.
- [27] Xu Y, Liu YC, Hu XY, et al. The synthesis of a 2D ultra-large protein supramolecular nanofilm by chemoselective thiol-disulfide exchange and its emergent functions. *Angewand Chem Int Ed*, 2020, 59(7): 2850-2859.
- [28] Zhao FN, Peydayesh M, Ying YB, et al. Transition metal dichalcogenide-silk nanofibril membrane for one-step water purification and precious metal recovery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(21): 24521-24530.
- [29] Shen Y, Posavec L, Bolisetty S, et al. Amyloid fibril systems reduce, stabilize and deliver bioavailable nanosized iron. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(7): 642-647.
- [30] Bruns CJ, Stoddart JF. Molecular machines muscle up. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8(1): 9-10.
- [31] Mao LB, Gao HL, Yao HB, et al. Synthetic nacre by predesigned matrix-directed mineralization. *Science*, 2016, 354(6308): 107-110.

(本文责编 郝丽芳)