

# 影响类弹性蛋白多肽自组装成微球的因素及其作用机制

葛慧华, 王文研, 张光亚, 王士斌

华侨大学生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

葛慧华, 王文研, 张光亚, 等. 影响类弹性蛋白多肽自组装成微球的因素及其作用机制. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1274-1282.

Ge HH, Wang WY, Zhang GY, et al. Factors and mechanism influencing elastin-like polypeptides self-assembled into micron-sized particles. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1274-1282.

**摘要:** 影响类弹性蛋白多肽 (ELPs) 自组装成微球的因素较多, 目前尚缺乏系统研究。以类弹性蛋白多肽 [KV8F] $n$  为对象, 利用动态光散射仪测定了不同条件下其自组装成微球的粒径。结果表明: 随着分子量的增加 ELPs 形成的微球粒径也随之增大, 粒径的均一度减小; 当盐浓度低于 0.4 mol/L 时, 盐浓度的增加, 微球粒径相应增加, 而盐浓度高于 0.4 mol/L 则呈减少的趋势, 但粒径均大于 1.1  $\mu\text{m}$ ; 而当 ELPs 末端融合木聚糖酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶后, 其自组装形成的微球粒径急剧减小, 约为游离 ELPs 的 1/10, 分别为 151.0 nm 和 174.2 nm。导致这种现象的原因可能是酶分子和 ELPs 通过静电引力相互作用后, 酶分子的空间位阻妨碍了 ELPs 分子的聚集。

**关键词:** 类弹性蛋白多肽, 静电引力, 空间位阻, 自组装, 融合蛋白

## Factors and mechanism influencing elastin-like polypeptides self-assembled into micron-sized particles

Huihua Ge, Wenyan Wang, Guangya Zhang, and Shibin Wang

Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China

**Abstract:** Many factors influence the elastin-like polypeptides (ELPs) self-assembled into micron-sized particles.

**Received:** November 5, 2013; **Accepted:** December 31, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 21376103, 31170939), Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2013J01048).

**Corresponding author:** Shibin Wang. Tel: +86-592-6162326; E-mail: sbwang@hqu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 21376103, 31170939), 福建省自然科学基金 (No. 2013J01048) 资助。

网络出版时间: 2014-05-23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130560.html>

However, few efforts were made to investigate these factors. Using the ELPs [KV8F] $n$  as the target, we studied systematically the factors with the dynamic light scattering. Our results show that the particle size increased and the uniform of particles decreased with the increase of the molecular weight. The analysis of size variation in self-assembled ELPs in response to changes in salt concentration indicated that the size increased with increasing the salt concentration, and the opposite response was observed when the concentration was above 0.4 mol/L. Under these conditions, the particles are micron-sized and larger than 1.1  $\mu\text{m}$ . However, when the fusions containing the same ELPs and xylanase or 1,3-propanediol oxidoreductase, the size of the self-assembled ELPs particles decreased dramatically, which was only about 1/10 of that of the free ELPs. We proposed that the solvent accessible charged area of the enzymes could interact with the ELPs, the sterical hindrance of the enzymes prevent the aggregation of the ELPs. This might be the most important parameter in altering the particle size sharply.

**Keywords:** Elastin-like polypeptides, electrostatic interaction, sterical hindrance, self-assemble, fusion protein

类弹性蛋白多肽 (Elastin-like polypeptides, ELPs), 由于能智能响应温度, 加之良好的生物相容性和稳定性, 是一种良好的生物材料。它包含数个重复序列 (VPGXG), 其中 X 代表除脯氨酸以外的任一氨基酸<sup>[1]</sup>。类弹性蛋白多肽 (ELPs) 自组装所形成的纳米级或微米级颗粒在酶分离纯化及固定化、药物包埋及靶向运输等方面极具应用潜力。研究者利用 ELPs (VPAVG) 220 所形成的颗粒 (其平均粒径为 237.5 nm) 封装骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic protein), 其封装率高达 94.5%, 且 14 d 以后所封装的蛋白仍然保持活性, 显示了 ELPs 在骨组织工程领域巨大的潜在用途<sup>[2]</sup>。最近, 研究者发现, 不同类型 ELPs 在 37 °C 条件下可形成粒径均一的颗粒, 其直径从 6 nm 到 1 602 nm 不等<sup>[3]</sup>, 由于能在适宜温度下形成尺寸合适的颗粒, 有望在体内和体外得到应用; 而经特殊设计的 ELPs 在 37 °C 和 pH 7 时, 可自发形成高度均一的颗粒 (粒径 500 nm 左右), 通过在其末端融合角质化细胞生长因子, 用于蛋白类药物的定向运送, 其治疗慢性伤口 (Chronic wounds) 的效果显著提高<sup>[4]</sup>。

然而, ELPs 所形成的微米/纳米颗粒尺寸与多种因素有关, 如: 残基 X 的类型、多肽链长度, 溶液中盐浓度及所融合的目标蛋白性质等, 目前对此缺乏系统和定量研究, 相关报道很少。而探明影响 ELPs 自组装成微纳米颗粒的主要因素, 可为精确控制其尺寸以适应不同情况下的应用提供重要信息, 基于此, 本文探讨了不同条件下 ELPs 自组装成微球粒径的大小及分布情况, 并对其可能的分子机制进行了阐述。

## 1 材料与方法

### 1.1 不同长度 ELPs 的获取

本文所使用的 ELPs 为 [KV8F] $n$ , 其中  $n$  为重复数,  $n$  分别为 40、60、80、120 及 140。这些不同长度的 ELPs 通过 RDL 法<sup>[5]</sup> (Recursive directional ligation, RDL) 由 20 个重复的 ELPs 延长得到 (其分子量为 9 kDa), 所得延长后的 ELPs 对应的分子量分别为 18 kDa、27 kDa、36 kDa、54 kDa 及 63 kDa。木聚糖酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶与 ELPs 融合基因由本实验室前期构建, 前者有 191 个氨基酸组成, 分子量为 20 kDa, 其等电点为 8.9; 后者由 387 个氨基酸

组成, 分子量为 41 kDa, 等电点为 5.9, 通过基因合成的方法获得这两个酶的基因序列<sup>[6-7]</sup>。文中所使用的表达载体为修饰后的 pET-22b (+), 表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3), 二者均为本实验室保存。所使用的培养基为 TB 培养基, 37 °C 下 250 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导其表达, 诱导时间为 3 h, 之后 4 °C 下离心收集菌体, 用冷 PBS 缓冲液重悬菌体, 置冰浴中超声破碎。ELPs 纯化采用 ITC (Inverse transition cycling, 可逆相变循环) 法, 其详细操作步骤见文献[8]。

### 1.2 ELPs 的定量及相变温度测定

ELPs 的定量采用紫外分光光度计测定 Trp 在 280 nm 处的消光系数, 建立标准曲线。通过测定 ELPs 在 280 nm 处的消光系数经标准曲线计算可得。ELPs 相变温度的测定为: 在 ELPs 的终浓度为 25  $\mu$ mol/L 的 PBS 缓冲液中 (pH 6.9), 利用配备有控温装置的紫外-可见分光光度计, 通过程序升温 (升温速率为 1 °C/min), 在波长 350 nm 处测定溶液的光密度, 相变温度的定义为: 在程序升温过程中, 溶液吸光度为最大吸光度一半时所对应的温度<sup>[9]</sup>。

### 1.3 ELPs 粒径及 Zeta 电位的测定

将不同长度的 ELPs 溶解于 PBS 缓冲液中 (pH 6.9), 使其终浓度为 25  $\mu$ mol/L, 从配置好的样品中取 1 mL 加入样品池, 温度升高至所设定的温度, 平衡 2 min 后, 采用动态光散射 (DLS) 测定样品粒度, 文中粒径大小为样品中所有颗粒大小平均值, 峰宽则是大小分布的标准偏差。而 Zeta 电位则是从上述样品中取 0.5 mL 缓缓注入倒立的弯曲式毛细管样品池中, 当样品到达样品池 U 形管低端时 (防止冲入气泡), 将样品

池正立, 注满样品, 平衡 2 min 后, 测量 Zeta 电位。所使用的仪器为英国马尔文公司的 NanoZS Zeta 电位仪, 样品粒径在中科院城市环境研究所测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同长度 ELPs 的制备及粒径扫描温度的选择

表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 经培养, 加入 IPTG 诱导表达后, 经细胞破碎及 ITC (Inverse transition cycling, 可逆相变循环) 分离纯化 ELPs 后, 所得 ELPs 经电泳后所得图谱如图 1 所示。由图可知, 不同长度 ELPs 电泳条带清晰可见, 条带较窄, 易辨认, 由其电泳条带在 SDS-PAGE 中位置可推测其分子量与预期一致。电泳图经 BandScan 软件分析 ELPs 纯度, 结果显示所有 ELPs 条带纯度均达 98% 以上, 符合后续实验要求。

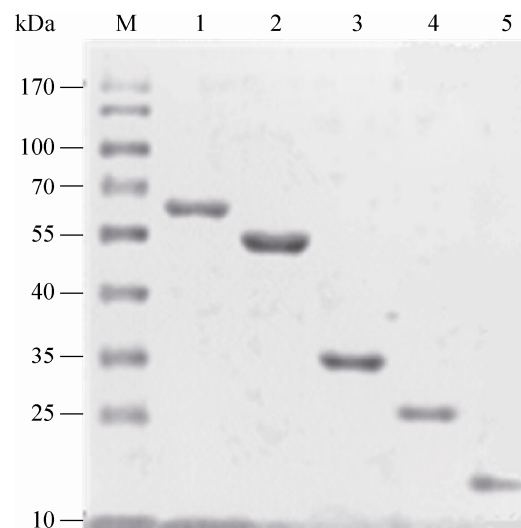


图 1 不同长度 ELPs 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of different ELPs. M: marker; 1: ELPs140; 2: ELPs120; 3: ELPs80; 4: ELPs60; 5: ELPs40.

在氯化钠终浓度为 0.5 mol/L 的 PBS 缓冲液中测定不同长度 ELPs 在升温过程中, 其在 350 nm 处吸光值的变化如图 2 所示。由图可知, 在很窄的温度范围内 (2~3 °C), 溶液吸光值急剧上升, 这表明 ELPs 在该温度范围内发生了相变, 其溶解度显著降低, 且温度下降时, ELPs 又重新溶解在溶液中, 即该过程是一个可逆的过程。而随着 ELPs 分子量增大其发生相变的温度也逐渐下降, 这与之前报道吻合<sup>[10]</sup>。从图中还可以看出, 当温度为 40 °C 时, 几乎所有的 ELPs 分子均完全发生相变, 其吸光值达到最大, 鉴于此, 为了保证后续粒径测定时温度的统一性, 故在后续试验过程中选取样品池的温度均为 40 °C。

## 2.2 不同长度 ELPs 对所形成微球粒径的影响

在相同条件下测定了不同长度 ELPs 自组装成微球的粒径大小, 结果如表 1 所示。从表中可以看出, 随着 ELPs 分子量的增加, 其自组装所形成的微球粒径逐渐增大, 其粒径范围在 1.1 μm 至 3.6 μm 之间, 其中 ELPs60 与 ELPs80

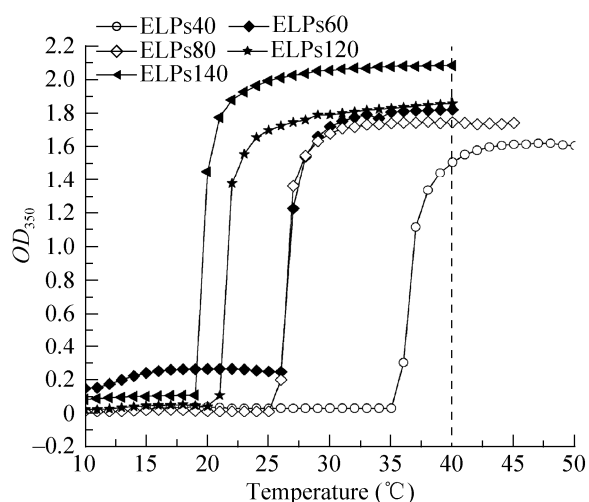


图 2 不同长度 ELPs 相变图

Fig. 2 The phase transition of different ELPs.

表 1 ELPs 长度对粒径大小及均一度的影响

Table 1 Influence of ELPs on the size and uniformity of the particle

ELP length	Particle diameter (nm)	Peak width (nm)
ELP40	1 109	185.8
ELP60	2 029	204.2
ELP80	2 252	467.1
ELP120	2 547	457.5
ELP140	3 636	888.3

粒径相差较小, 而 ELPs120 和 ELPs140 粒径则相差较大。而从其粒径分布峰宽则反应了粒径的均一度, 随着 ELPs 分子量的增加, 其峰宽随之增大, 意味着粒径分布范围更广, 粒径的均一度下降。

通过测定相变前后溶液的 Zeta 电位, 结果发现在 ELPs 发生相变前溶液的 Zeta 电位一般都在 -11.7 mV 左右, 而发生相变后其 Zeta 电位一般都在 -0.1 mV, 此时, 相变后的 ELPs 分子易发生聚集从而形成微米级球体, 由于分子量大的 ELPs 分子中含有更多的苯丙氨酸 (F), 该氨基酸中含有共轭的苯环, 分子间更容易通过  $\pi$ - $\pi$  堆叠相互作用, 从而形成较大粒径的颗粒。而  $\pi$ - $\pi$  堆叠作用则在分子的自组装及定向堆积过程中发挥着重要作用<sup>[11-12]</sup>。此外, 由于苯丙氨酸在 ELPs 分子中每 10 个重复出现一次, 其均匀分布在 ELPs 分子中, 随着 ELPs 分子量的增加, 其中的苯丙氨酸可在分子内部及分子之间通过  $\pi$ - $\pi$  堆叠相互作用, 这就使得 1 个或多个 ELPs 分子在相变过程中通过该方式聚集在一起, 聚集的分子越多则最终颗粒粒径越大。分子量大的 ELPs 分子通过苯丙氨酸更容易结合数量不等的其他 ELPs 分子, 这就导致分子量大的 ELPs 分子最终自组装所形成的颗粒粒径分布的

范围越宽,其均一度也就随之下降。

### 2.3 盐浓度对 ELPs 所形成微球粒径的影响

测定了不同盐浓度下各 ELPs 自组装形成微球的粒径,其中盐包括氯化钠、氯化钾、碳酸钠和碳酸钾,使用的 ELPs 包括 ELPs40 和 ELPs80。图 3 是以氯化钠及 ELPs80 为例所得的实验结果。由图可知,随着盐浓度的增加,粒径大小呈现先增加后减少的趋势,其粒径大小在 1.7  $\mu\text{m}$  到 3.0  $\mu\text{m}$  之间,而峰宽也基本呈现先增后减的趋势,其变化范围在 0.3  $\mu\text{m}$  到 0.7  $\mu\text{m}$  之间。意味着其均一度先减小而后增加。Hong 等研究了氯化钠浓度对离子互补型多肽 EAK16-II 自组装成纳米颗粒粒径的影响,结果发现氯化钠浓度确实会影响纳米颗粒粒径,在其浓度低于 20 mmol/L 时,增加盐浓度会使其粒径增加,而高于 20 mmol/L 时,增加盐浓度则起到相反的结果<sup>[13]</sup>。而本实验过程中也观察到类似现象。由于盐浓度的改变主要是改变分子自组装时静电相互作用从而影响其聚集成微

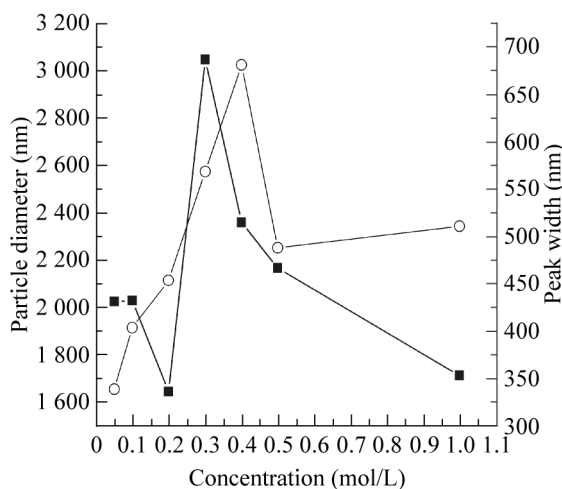


图 3 盐浓度对粒径大小及均一度的影响

Fig. 3 Influence of salt concentration on the size and uniformity of particles.

球<sup>[14]</sup>,而本文所使用的 ELPs 中含有碱性氨基酸——赖氨酸 (K),它在近中性的 PBS 溶液中会带正电荷。此外,其他盐浓度对 ELPs 粒径的影响也呈现类似趋势,但不同盐出现拐点的浓度有差异,但所有情况下粒径大小均大于 1 109 nm,颗粒均为微米级。

### 2.4 外源融合蛋白对 ELPs 所形成微球粒径的影响

在 ELPs[KV8F]20 的 N 端融合上外源蛋白后,测定了外源蛋白对其形成微球粒径的影响,结果如图 4 所示。由图可知,当 ELPs 末端融合上外源蛋白后,其自组装成微球的粒径急剧减少,融合有 1,3-丙二醇氧化还原酶 (PDOR) 的粒径平均大小为 151.0 nm (图 4A),融合有木聚

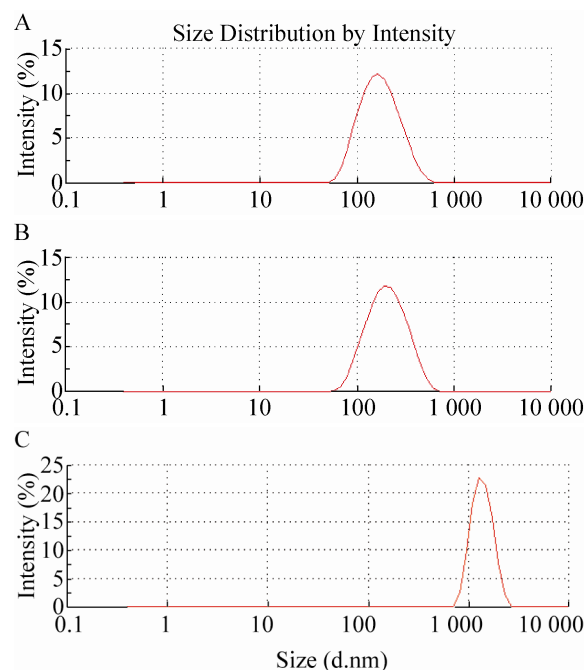


图 4 融合及未融合 ELPs 粒径大小及分布

Fig. 4 Particle size and distribution of ELPs with and without fusion proteins. (A) Fusion with 1,3-propanediol oxidoreductase. (B) Fusion with xylanase. (C) Free ELPs.

糖酶的(图4B)的粒径平均大小为174.2 nm,而同样游离的ELPs所形成的微球平均粒径为1 450 nm(图4C),约为融合外源蛋白后粒径的10倍,但其粒径分布范围较窄,均一度较好。结合之前结果可以看出,虽然ELPs的分子量,盐浓度和盐类型均会影响到微球的粒径,但其范围均在1.1  $\mu\text{m}$ 至3.6  $\mu\text{m}$ 之间,但融合外源蛋白后,其粒径剧降,均小于0.2  $\mu\text{m}$ ,与真正意义上的纳米颗粒粒径小于0.1  $\mu\text{m}$ 更接近。因此,有望通过调控外界条件,使融合有外源酶蛋白的ELPs分子自组装成纳米级颗粒,形成“纳米酶”,既能稳定外源融合酶的结构,又克服了微米级载体存在的传质和催化效率低问题<sup>[15-16]</sup>,提供一种全新制备纳米酶的方法。

ELPs末端融合外源蛋白分子对其粒径的影响已有报道,Bessa等<sup>[2]</sup>发现ELPs [PGVGV]160自组装形成的颗粒粒径在1 600 nm左右,而当其末端融合不同长度(从22到176个氨基酸)的天冬氨酸后,颗粒粒径显著下降,粒径最大约为250 nm,多数都在50 nm左右。而Yoshihiko等<sup>[3]</sup>则发现,在ELPs末端融合角质化细胞生长因子(KGF)后,ELPs自组装形成的颗粒粒径未发生显著变化,融合后粒径仅减少了20 nm,差异不明显。但文中均未对该现象作出任何解释。

此外,融合外源蛋白后导致ELPs粒径变化这一现象的原因亦无文献报道。最近,有文献研究了ELPs融合蛋白后其相变温度的变化规律,通过计算融合蛋白的溶剂可及性表面及氨基酸的理化性质,经相关性分析表明:蛋白质溶剂可及性表面的氨基酸电荷是影响ELPs相变温度变化的最重要因素<sup>[17]</sup>。鉴于此,我们通过SWISS-MODEL以同源建模方法<sup>[18]</sup>构建了所融

合的1,3-丙二醇氧化还原酶以及木聚糖酶的3D结构,并从PDB数据库找到了人角质化细胞生长因子的结构(ID号:1QQL)<sup>[19]</sup>,通过Accelrys discovery studio visualizer计算了各分子表面的电荷分布,结果如图5所示。由图中可以看出,1,3-丙二醇氧化还原酶表面负电荷较多,人角质化细胞生长因子表面正电荷较多,木聚糖酶分子表面负电荷略多于正电荷,此外,Bessa等<sup>[2]</sup>所融合的蛋白为长度从22到176个的聚天冬氨酸,该氨基酸在中性条件下带负电荷,其分子表面全部带负电荷。另一方面,在本文及文献<sup>[2]</sup>中所使用的ELPs分子中均含有带正电荷的Lys,这样融合外源蛋白后,这些蛋白很容易通过静电引力和ELPs相互作用并形成相对稳定的复合结构,由于所融合分子存在较大的空间位阻(见图6A和6B,分子的相互作用通过pyDockWEB建立<sup>[20]</sup>,PDOR和木聚糖酶与ELPs静电引力的能量分别为-11.198 kcal/mol和-2.853 kcal/mol),当ELPs自组装成颗粒时,就严重阻碍了ELPs分子的聚集,从而导致其所形成的颗粒急剧减小。此外,通过VMD<sup>[21]</sup>计算了融合前ELPs、PDOR和木聚糖酶的溶剂可及性表面积(SASA),其大小分别为7 959.24  $\text{\AA}^2$ ,16 359.05  $\text{\AA}^2$ 和8 218.65  $\text{\AA}^2$ ,而当ELPs和PDOR及木聚糖酶融合后,融合蛋白的溶剂可及性表面积分别为23 449.38  $\text{\AA}^2$ 及15 103.30  $\text{\AA}^2$ ,相比未融合时,融合蛋白的SASA值分别减少了868.91  $\text{\AA}^2$ 和1 074.59  $\text{\AA}^2$ 。由此可进一步说明PDOR及木聚糖酶与ELPs融合后确实存在较明显的空间位阻。另一方面,文献<sup>[3]</sup>中融合蛋白分子表面虽然也带有较多的正电荷,但其所用ELPs分子中无带电氨基酸,融合蛋白和ELPs静电相互作用很弱,结合不稳定,当ELPs发生

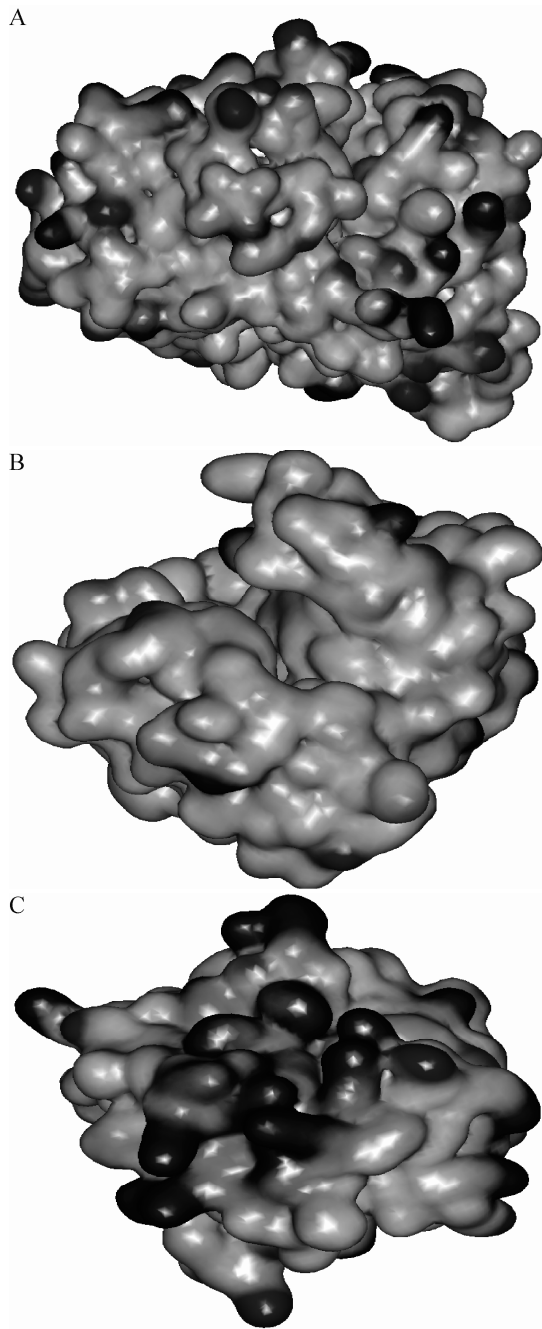


图5 几种蛋白分子可及表面电荷分布  
Fig. 5 Solvent accessible charge distribution of the proteins. (A) 1,3-propanediol oxidoreductase. (B) Xylanase. (C) Keratinocyte growth factor. The dark grey means the positive charged residues; the light grey means the negative charged residues.

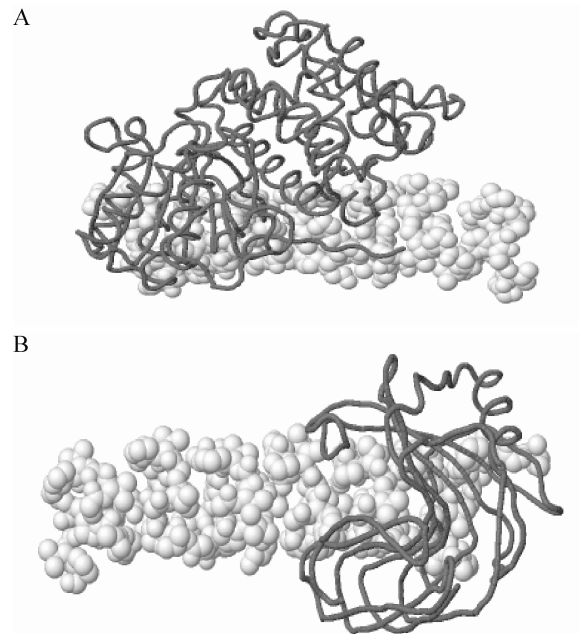


图6 ELPs与蛋白融合的相互作用  
Fig. 6 The interaction between the ELPs and fusion protein. (A) 1,3-propanediol oxidoreductase. (B) Xylanase. The fusion proteins are in dark grey, the ELPs are in light grey.

自组装时,其不能结合在ELPs分子表面,故空间位阻很小,同游离ELPs相差不大,因此,粒径减少不明显。总之,由于融合蛋白和ELPs分子带相反电荷,分子间容易通过静电引力相互作用而结合,由于融合蛋白的空间位阻大,阻碍了更多ELPs分子的聚集,这可能是导致其粒径显著下降的重要原因。

### 3 讨论

本文较系统研究了影响ELPs自组装成微球的影响因素,结果发现,相比与盐浓度和ELPs分子量,ELPs所融合的目标蛋白对其粒径的影响最大,并提出融合蛋白导致ELPs自组装成微球粒径急剧下降的原因是由于其分子表面带电荷,通过静电引力与ELPs分子相互结合,由于

融合蛋白较大的空间位阻而妨碍了ELPs分子的聚集。为了进一步证实该论断,需选择更多的融合蛋白,从中找出规律,以期阐明其分子机制,这将是后续研究的一个重点方向。

了解影响 ELPs 自组装成微纳米颗粒的因素,并掌握其中的关键要素,为精确控制颗粒的粒径提供了便利,并能从分子层面探寻该影响因素发挥作用的机制;另一方面,若能控制颗粒粒径在一个合适范围,则能拓宽其应用范围,如在药物包埋和释放方面<sup>[22]</sup>,可提高载药量,延长药物释放时间,在靶向药物控释载体方面有很好的发展前景<sup>[23]</sup>。此外,由于 ELPs 在重组酶分离方面具有的巨大优势<sup>[24-25]</sup>,若融合有重组酶的 ELPs 能自组装成纳米级颗粒,则将其作为固定化酶的纳米载体,实现酶分离、纯化及固定化同步完成,非常有利于过程集成,同时也可考虑将其同膜分离技术相结合<sup>[26]</sup>,以提高催化效率,相关的研究仍在不断深入进行中。

## REFERENCES

- [1] Hassouneh W, Macewan SR, Chilkoti A. Fusions of elastin-like polypeptides to pharmaceutical proteins. *Methods Enzymol*, 2012, 502: 215–237.
- [2] Bessa PC, Machado R, Nürnberger S, et al. Thermo-responsive self-assembled elastin-based nanoparticles for delivery of BMPs. *J Control Release*, 2010, 142(3): 312–318.
- [3] Yoshihiko F, Masayasu M, Eiry K. Construction of nanoscale protein particle using temperature-sensitive elastin-like peptide and polyaspartic acid chain. *Biomaterials*, 2009, 30: 3450–3457.
- [4] Koria P, Yagi H, Kitagawa Y, et al. Self-assembling elastin-like peptides growth factor chimeric nanoparticles for the treatment of chronic wounds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(3): 1034–1039.
- [5] Meyer DE, Chilkoti A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules*, 2002, 3(2): 357–367.
- [6] Li W, Ng I-Son, Fang BS, et al. Expression and non-chromatographic purification of 1,3-propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*. *Electronic J Biotechnol*, 2011, 14(6): <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue6-fulltext-2>.
- [7] Fu XP, Wang WY, Zhang GY. Construction of an expression vector with elastin-like polypeptide tag to purify xylanase. *Acta Microbiol Sin*, 2012, 52(1): 90–95 (in Chinese).  
付晓平, 王文研, 张光亚. 以类弹性蛋白多肽为标签的表达质粒构建及其用于木聚糖酶的非色谱纯化. *微生物学报*, 2012, 52(1): 90–95.
- [8] Huang KZ, Li JJ, Wang WY, et al. De novo design, non-chromatographic purification and salts effect of elastin-like polypeptides. *Chin J Biotech*, 2011, 27(4): 661–666 (in Chinese).  
黄凯宗, 李晶晶, 王文研, 等. 类弹性蛋白多肽的从头设计、非色谱纯化及盐效应. *生物工程学报*, 2011, 27(4): 661–666.
- [9] Lim DW, Kimberly TC, MacKay JA, et al. Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 2007, 8(5): 1417–1424.
- [10] Meyer DE, Chilkoti A. Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 846–851.
- [11] Ziserman L, Lee H, Raghavan SR, et al. Unraveling the mechanism of nanotube formation by chiral self-assembly of amphiphiles. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(8): 2511–2517.
- [12] Gazit E. A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *Faseb J*, 2002, 16(1): 77–83.



- [13] Hong Y, Pritzker MD, Legge RL, et al. Effect of NaCl and peptide concentration on the self-assembly of an ionic-complementary peptide EAK16-II. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, 46(3): 152–161.
- [14] Hong Y, Legge RL, Zhang S, et al. Effect of amino acid sequence and pH on nanofiber formation of self-assembling peptides EAK16-II and EAK16-IV. *Biomacromolecules*, 2003, 4(5): 1433–1442.
- [15] Kim J, Grate JW, Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(11): 639–646.
- [16] Wang P. Nanoscale engineering for smart biocatalysts with fine-tuned properties and functionalities. *Top Catal*, 2012, 55: 1107–1113.
- [17] Christensen T, Hassounh W, Trabbic-Carlson K, et al. Predicting transition temperatures of elastin-like polypeptide fusion proteins. *Biomacromolecules*, 2013, 14(5): 1514–1519.
- [18] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195–201.
- [19] Ye S, Luo Y, Lu W, et al. Structural basis for interaction of FGF-1, FGF-2, and FGF-7 with different heparan sulfate motifs. *Biochemistry*, 2001, 40(48): 14429–14439.
- [20] Jiménez-García B, Pons C, Fernández-Recio J. pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring. *Bioinformatics*, 2013, 29(13): 1698–1699.
- [21] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 1996, 14(1): 33–38.
- [22] Herrero-Vanrell R, Rincon AC, Alonso M, et al. Self-assembled particles of an elastin like polymer as vehicles for controlled drug release. *J Control Release*, 2005, 102(1): 113–122.
- [23] McDaniel JR, Callahan DJ, Chilkoti A. Drug delivery to solid tumors by elastin-like polypeptides. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(15): 1456–1467.
- [24] Floss DM, Schallau K, Stefan RJ, et al. Elastin-like polypeptides revolutionizes recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 37–45.
- [25] Mee C, Bankia MR, Wood DW. Towards the elimination of chromatography in protein purification: expressing proteins engineered to purify themselves. *Chem Eng J*, 2008, 135: 56–62.
- [26] Ge X, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A, et al. Purification of an elastin-like fusion protein by microfiltration. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95: 424–432.

(本文责编 郝丽芳)