

# 蛋白质精准修饰客体分子的方法

戴震<sup>1,2</sup>, 刘育<sup>1</sup>, 刘涛<sup>2,3,4\*</sup>

(1. 南开大学化学学院, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071;

2. 北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室,

3. 化学生物学交叉中心,

4. 药学院分子与细胞药理学系, 北京 100191)

**摘要** 客体分子在蛋白质上的精准修饰为超分子调控蛋白质活性提供了重要技术基础, 尤其是带正电荷的芳香官能团客体, 可以与葫芦脲高效地结合. 然而, 该类分子很难通过非天然氨基酸定点修饰技术精准修饰到蛋白质上, 而生物正交反应的连接子通常又较大从而影响主客体分子识别. 为此, 本文通过非天然氨基酸定点修饰技术先将带碘或炔烃官能团的非天然氨基酸定点修饰到目的蛋白质上, 再通过钯催化的 Suzuki 和 Sonogashira 偶联反应进一步修饰上带有正电荷的吡啶分子, 以期与葫芦脲分子高效识别结合. 通过对反应条件的筛选插入了带有炔烃官能团的非天然氨基酸, 并通过 Sonogashira 偶联反应在蛋白质表面定点偶联带正电荷的吡啶分子, 为主客体化学调控蛋白质奠定了重要的技术基础.

**关键词** 精准修饰; 非天然氨基酸; 主客体; 蛋白质

中图分类号 O621.3; O641.3

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240090

## Methodologies for the Precise Modification of Guest Molecules by Proteins

DAI Zhen<sup>1,2</sup>, LIU Yu<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>2,3,4\*</sup>

(1. College of Chemistry, State Key Laboratory of Element of Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences,

3. Chemical Biology Center,

4. Department of Molecular and Cellular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

**Abstract** Precise modification of guest molecules on proteins is a crucial technological foundation for supramolecular modulation of protein activity. This is especially true for aromatic functional group guests containing positive charges, which can be efficiently bound to cucurbituril. However, precise modification of these molecules on proteins using non-canonical amino acid site specific modification technology can be challenging. The linkers of bioorthogonal reactions are often large, which can affect the recognition of the host and guest molecules. To address this issue, the target proteins were modified by adding iodine- or alkynyl-functional amino acids using the non-canonical amino acid site specific modification technology. The pyridine molecules with a positive charge were efficiently bound to cucurbituril molecules using the palladium-catalyzed Suzuki and Sonogashira coupling reaction. Subsequently, a non-natural

收稿日期: 2024-02-23. 网络首发日期: 2024-03-19.

联系人简介: 刘涛, 男, 博士, 研究员, 主要从事蛋白质药物化学修饰、基因编辑与细胞治疗方面的研究. E-mail: taoliupku@pku.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22325701, U22A20332, 92156025, 92253301)和国家重点研发计划项目(批准号: 2022YFA0912400, 2021YFA0909900)和北京市自然科学基金(批准号: JQ20034)的资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos.22325701, U22A20332, 92156025, 92253301), the National Key Research and Development Program of China(Nos.2022YFA0912400, 2021YFA0909900) and the Beijing Natural Science Foundation, China(No.JQ20034).

amino acid with an alkynyl functional group was successfully incorporated into the target proteins using a series of reaction conditions. Furthermore, a Sonogashira coupling reaction was utilized to attach a positively charged pyridine molecule to the protein surface. These accomplishments establish a crucial technological basis for the chemical regulation of proteins through host-guest interactions.

**Keywords** Precise modification; Non-canonical amino acid; Host and guest; Protein

基于内部空腔空间的合成大环(如环糊精<sup>[1]</sup>、杯芳烃<sup>[2]</sup>、葫芦脲<sup>[3]</sup>和柱芳烃<sup>[4]</sup>等)的超分子主客体识别是模拟与调节蛋白质和核酸等多种天然生物大分子结构和功能的有力工具<sup>[5]</sup>。在可作为调节蛋白质-蛋白质相互作用的有效手段中,人工加入可识别被合成大环分子内部空腔特异性识别的分子结合位点尤为重要<sup>[3,5,6]</sup>。因此,合成大环分子-蛋白质超分子组装体的多样性和独特性为各领域的研究工作带来了全新的动力和巨大的潜力<sup>[7,8]</sup>,如生物催化反应、生物传感器件、可控的能量转移、组装体形态学水平上的相互转换以及细胞的活力调节等<sup>[9,10]</sup>。

通常,人工加入可识别被合成大环分子内部空腔特异性识别的分子结合位点的研究工作是通过寻找具有良好主客体识别性质的天然氨基酸序列,如“苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸”序列,与葫芦脲主体分子的主客体识别,但基于此序列的主客体识别应用局限于蛋白质的氮端<sup>[11-14]</sup>,对此类研究的扩展应用具有极大的局限性。此外,一些研究工作是通过蛋白质表面的天然氨基酸残基的非特定位点反应引入可以特异性识别的分子结合位点。Scherman等<sup>[15]</sup>利用马来酰亚胺-硫环烯点击化学在蛋白上修饰紫精和萘环官能团,以期与葫芦脲<sup>[8]</sup>的内部空腔组装成三元复合体。Brunsveld等<sup>[16]</sup>利用硫醇-硫酯交换反应在荧光蛋白上修饰了甲基紫精和萘环官能团,在葫芦脲<sup>[8]</sup>大环分子的空腔驱动下可以形成异源二聚体,从而观察到荧光共振能量转移(FRET)现象。

非天然氨基酸定点修饰技术是通过在细菌或细胞等生命体内导入具有特异性识别非天然氨基酸能力的外源 tRNA 及与其相对应可以识别的氨酰 tRNA 合成酶,通过催化特定的非天然氨基酸与外源 tRNA 结合,在进入核糖体之后,再识别 mRNA 序列上的琥珀终止密码子序列(UAG),以实现非天然氨基酸的定点插入<sup>[17-19]</sup>。结合非天然氨基酸定点修饰技术可以设计得到多种通过传统方法很难纯化或者具有全新功能的蛋白质<sup>[20]</sup>,从而突破前人的技术壁垒,扩展人工加入可识别被合成大分子内部空腔特异性识别的分子结合位点的方法<sup>[21-23]</sup>。Chen等<sup>[24]</sup>报道了插入带有炔烃官能团的非天然氨基酸通过钯催化的 Sonogashira 偶联反应可实现蛋白质水平甚至大肠杆菌体内的位点特异性标记。Davis等<sup>[25]</sup>报道了插入带有碘官能团的 4-碘-苯丙氨酸可通过钯催化的 Suzuki 偶联反应实现蛋白质水平的 PEG 化(PEGylation, 聚乙二醇修饰)。

本课题组<sup>[8,26]</sup>基于非天然氨基酸定点修饰技术实现了含客体氨基酸的蛋白质精准修饰,从而实现了蛋白质活性的超分子可逆调控。然而该体系效率不高,原因在于可通过非天然氨基酸定点修饰技术插入的客体分子结构有限<sup>[27]</sup>。基于超分子主客体识别原理,葫芦脲分子与带有正电荷的芳香官能团分子具有高效的识别结合能力,然而该类分子却很难通过非天然氨基酸定点修饰技术精确修饰到蛋白质的特定位点上<sup>[17]</sup>。因此考虑先定点插入可发生进一步反应的非天然氨基酸,然后通过进一步反应修饰上目标客体分子。Marx等<sup>[28]</sup>基于 Cu(I)催化的叠氮-炔基环加成反应可在蛋白质目标位点修饰上多种功能性分子,然而部分蛋白质对铜敏感不利于客体分子的进一步修饰。基于多种生物正交反应(二苯并环辛炔与叠氮之间的点击化学反应以及四嗪与反式环辛烯之间的狄尔斯-阿尔德环加成反应),结合非天然氨基酸定点修饰技术开展了一系列研究<sup>[29,30]</sup>,然而反应所需官能团的空间位阻过大,对于后续主客体识别存在潜在干扰的可能。

基于以上研究背景,本文设计合成并插入了一系列带有碘或者炔烃官能团的非天然氨基酸,可在钯类催化剂参与的情况下发生 Suzuki 或 Sonogashira 偶联反应,随后进行了反应条件的优化,最终实现了在蛋白质特定位点上人工加入可被合成大环分子内部空腔特异性识别的分子结合位点,为基于超分子化学研究一系列蛋白生物领域的科学问题提供了新方法思路。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

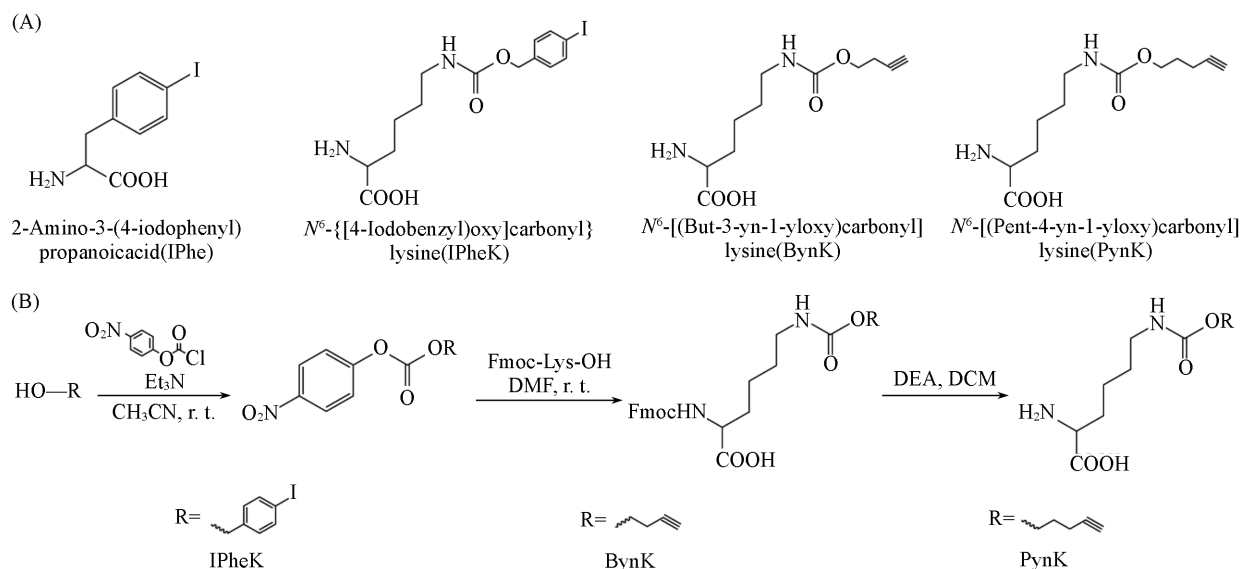
无水二氯甲烷(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯)、石油醚(分析纯)、无水甲醇(分析纯)、无水硫酸钠固体(分析纯)、浓盐酸(分析纯)、1,4-二碘苯(纯度98%)、乙腈溶液(分析纯)、碳酸铯(纯度99%)和碘甲烷(纯度98%),北京通广试剂公司;无水氯化铝粉末(纯度99%),日本梯希爱公司;无水碳酸钾固体(纯度99%)、乙酰氯(纯度98%)、4-吡啶硼酸(纯度98%)、Fmoc-L-赖氨酸盐酸盐(纯度98%)、4-碘卞醇(纯度97%)和4-碘代苯丙氨酸(纯度97%),上海毕得医药公司;三氟乙酸溶液(纯度99%)、氯化亚砷溶液(纯度99%)、4-戊炔-1-醇(纯度97%)、对硝基苯基氯甲酸酯(纯度98%)、4-丁炔-1-醇(纯度98%)和吡啶溶液(纯度99%),上海安耐吉公司;氢氧化锂(纯度99%)和三乙胺(纯度99%),北京伊诺凯公司;2xPhanta<sup>®</sup>Max Master Mix和10×DNA上样缓冲液,南京诺维赞公司;Gibson Assembly<sup>®</sup>, NheI-HF和XhoI,北京纽英伦公司;QuickBlue快速染胶液,苏州博奥龙公司;FastAP, GeneRuler 1kb DNA Ladder和PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder, 10000~180000、胰蛋白胍和酵母提取物,美国赛默飞世尔科技公司;DH5 $\alpha$ 感受态细胞和BL21感受态细胞,北京康为世纪公司;氯化钠、琼脂、Agarose和过硫酸铵(APS),美国西格玛公司;氨苄青霉素、壮观霉素和IPTG,美国INALCO公司;L-(+)-Arabinose和甘氨酸,上海生工公司;30%丙烯酰胺-双丙烯酰胺溶液、4×分离胶缓冲液和4×浓缩胶缓冲液,北京普利莱公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液,美国MSB公司;十二烷基硫酸钠(SDS),美国Amerosco公司;10×磷酸盐(PBS)缓冲液,北京中科迈晨公司;溶菌酶,美国VWR公司;Ni-NTA Agarose,德国Qiagen公司;6×蛋白上样缓冲液,海门市联盛公司;聚丙烯酰胺快速蛋白电泳预制胶,南京金斯瑞公司。

AV400型核磁共振波谱仪(NMR),瑞士Bruker公司;BioTek Synergy H1型酶标仪,美国安捷伦公司;Xevo G2-XS quadrupole-time-of flight型高分辨质谱仪(Q-TOF),美国沃特世公司;NanoDrop One C型分光光度计,美国赛默飞世尔科技公司;Cyto FLEX型流式细胞仪,美国贝克曼公司;C1000 Touch型聚合酶链式反应仪(PCR),美国伯乐(Bio-Rad)公司;HE-220型高通量水平电泳槽和Tanon 1600型系列多功能凝胶图像分析系统,上海天能公司;VCX130型超声波细胞破碎仪,美国SONICS公司;ECM399型电穿孔仪,美国BTX公司。

实验所用引物序列见本文支持信息表S1,均由苏州金唯智公司购入。

### 1.2 实验过程

1.2.1 非天然氨基酸的合成 为在蛋白质的特定位点插入超分子识别的客体分子,选择Scheme 1(A)所示的4种非天然氨基酸.通过非天然氨基酸定点修饰技术插入带有碘或炔基官能团的非天然氨基



Scheme 1 Chemical structures(A) and syntheses(B) of noncanonical amino acids

酸, 再通过 Suzuki 或 Sonogashira 偶联反应修饰上超分子客体分子. 其中, IPhe 为直接购买, 其余 3 个非天然氨基酸的合成路线如 Scheme 1(B) 所示.

合成过程以 IPheK 为例, BynK 和 PynK 的合成路线与 IPheK 一致.

首先, 将 2.43 g 4-碘苄醇、2.50 g 对硝基苯基氯甲酸酯和 3.80 g 吡啶加入到 250 mL 烧瓶中, 用 120 mL 二氯甲烷溶液溶解, 于室温下搅拌反应 10 h. 反应结束后, 向反应液中加入 200 mL 二氯甲烷稀释, 并用饱和氯化钠溶液洗涤 3 次以上. 用无水硫酸钠干燥, 真空抽滤后, 将滤液旋转蒸发浓缩并拌硅胶上样. 浓缩柱层析分离 ( $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{石油醚}}=1:10$ ) 后的层析液得到活性酯中间体.

将 1.00 g 活性酯中间体、1.20 g Fmoc-L-赖氨酸盐酸盐和 0.70 g *N,N*-二异丙基乙胺 (DIPEA) 加入 100 mL 烧瓶中, 用 50 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液溶解, 于室温下搅拌反应 10 h. 待反应结束后, 向反应液中加入大量水稀释溶解生成的无机盐, 再用乙酸乙酯溶液萃取 3 次以上; 然后用饱和食盐水洗 3 次, 向有机相中加入无水硫酸钠干燥. 将柱层析分离 ( $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}}=20:1$ ) 得到的层析液旋转蒸发浓缩得到 Fmoc-IPheK. 将 Fmoc-IPheK 溶解于二乙胺/二氯甲烷混合溶液 ( $V_{\text{二乙胺}}:V_{\text{二氯甲烷}}=1:4$ ), 室温下反应 2 h. 待反应结束后, 经旋转蒸发浓缩即得产物 IPheK.

**1.2.2 非天然氨基酸插入效率的验证** 实验中采用绿色荧光蛋白作为插入效率的报告系统, 通过其荧光强度的高低来表征非天然氨基酸在原核体系的插入效率. 具体操作步骤如下: (1) 利用电转将 pET22B-sfGFP-Y151TAG 质粒与计划插入的非天然氨基酸所对应的 tRNA 合成酶 (RS) 共同转化进 BL21 大肠杆菌感受态细胞中, 涂板后于 37 °C 培养箱中培养过夜; (2) 挑取单菌落后, 置于含有壮观霉素和氨苄霉素的 2YT 培养基 (2×YT) 培养基中, 置于 37 °C 摇床中活化过夜; (3) 将活化后的菌液按照 1:50 的比例接种进 2 mL 含壮观霉素和氨苄霉素的 2×YT 培养基中, 于 37 °C 以 220 r/min 转速培养 2~3 h. 当  $OD_{600}$  值达到 0.6~0.8 时, 加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和非天然氨基酸, 再转移到 30 °C 摇床中以 220 r/min 转速培养过夜; 注意每种 RS 及非天然氨基酸均重复接种 3 管; (4) 10~12 h 后, 以 5000 r/min 转速离心 20 min, 弃去上层清液, 收取菌体沉淀; (5) 用 1 mL PBS 缓冲液重悬菌体, 取 20  $\mu$ L 稀释至总体积为 200  $\mu$ L 的 PBS 缓冲液中; (6) 将上述缓冲液加入黑色透光的 96 孔板中, 用酶标仪读取 600 nm 处的吸光度及 485 nm/512 nm 的荧光值, 485 nm/512 nm 与 600 nm 处的比值即为绿色荧光蛋白的单位表达量, 可反映非天然氨基酸在原核体系的插入效率.

**1.2.3 蛋白的表达和纯化** 实验中将 *E. coli* BL21 细胞用于原核蛋白的重组表达. 将含有相应质粒的重组菌接种到 2×YT 培养基中, 于 37 °C 培养至  $OD_{600}$  值达到 0.5~0.7, 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 将诱导后的培养液置于 25 或 18 °C 环境下培养过夜 (温度根据蛋白的性质决定), 诱导蛋白的表达. 对于含有非天然氨基酸的蛋白表达, 当重组菌  $OD_{600}$  值达到约 0.3 时, 加入适当浓度的非天然氨基酸 (1 mmol/L), 继续培养至  $OD_{600}$  值达到 0.6, 加入诱导剂 IPTG.

收集过夜培养的菌体, 重悬于细胞裂解液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)+200 mmol/L NaCl+10 mmol/L 咪唑+1 mg/mL 溶菌酶] 中并于 4 °C 孵育 1 h, 经超声裂解细胞, 于 18000g 转速离心 50 min, 除去沉淀收集上层清液, 加入 Ni-NTA 琼脂糖凝胶珠, 于 4 °C 孵育 1 h 后, 将混合物上样到重力柱中, 用清洗液 [25 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)+500 mmol/L NaCl+20 mmol/L 咪唑+体积分数 2% 的甘油] 冲洗 3 次, 除去杂蛋白, 再用洗脱液 (500 mmol/L NaCl+250 mmol/L 咪唑) 收集纯化的胞内蛋白.

将收集的菌体重悬于裂解液中, 于 4 °C 孵育 2 h, 用溶菌酶去除细胞壁, 释放胞间质蛋白, 以 18000g 的转速离心 50 min, 除去沉淀并收集上层清液, 余下步骤与胞内蛋白纯化一致. 将纯化后的蛋白溶液利用 Amicon Ultra column 换成蛋白储存液 [25 mmol/L Tris-HCl (pH=7.0)+75 mmol/L NaCl+体积分数 2% 的甘油], 分装后于 -80 °C 环境下保存. 纯化后的胞间质蛋白由 SDS-PAGE 和高分辨蛋白质谱鉴定.

**1.2.4 高分辨质谱分析** 为分析非天然氨基酸在原核细胞水平上的插入效率以及验证能否将目标超分子基元经过进一步反应修饰到蛋白特异位点上, 对蛋白样品进行了高分辨质谱分析. 对于其它蛋白, 上样浓度在 0.1~0.5 mg/mL 之间.

1.2.5 钯催化的蛋白表面 Suzuki 偶联反应条件 反应体系组成如下: 50  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 的蛋白、1.9  $\mu\text{L}$  100 mmol/L 带硼酸基团的小分子、1.1  $\mu\text{L}$  50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  或者 3  $\mu\text{L}$  10 mmol/L  $\text{Pd}(\text{OAc})_2 \cdot \text{L}_2$  和 6.5  $\mu\text{L}$  1 mol/L DTT.

1.2.6 钯催化的蛋白表面 Sonogashira 偶联反应条件 反应体系总体积为 120  $\mu\text{L}$ , 反应体系组成如下: 500  $\mu\text{mol/L}$  钯催化剂、5 mmol/L 抗坏血酸钠、500  $\mu\text{mol/L}$  带碘的小分子和 10  $\mu\text{mol/L}$  非天然氨基酸定点修饰插入的蛋白, 缓冲液体系为 pH=8.0 的 PBS 缓冲液.

## 2 结果与讨论

### 2.1 非天然氨基酸的原核插入

尝试利用实验室现有的 MbpY1RS 的突变体 AVRS(L274A, C313V, Y349F) 进行 IPheK 的插入实验, 将绿色荧光蛋白的 151 位点的酪氨酸突变成 TAG 以插入非天然氨基酸, 以荧光值 ( $\text{OD}_{600}$ ) 表征单位菌的绿色荧光蛋白表达量, 由荧光值 ( $\text{OD}_{600}$ ) [图 1(A)] 和蛋白质谱图 [图 1(B)] 可以看出, AVRS 可以高效地识别插入该氨基酸, 蛋白表达量高达 60 mg/L.

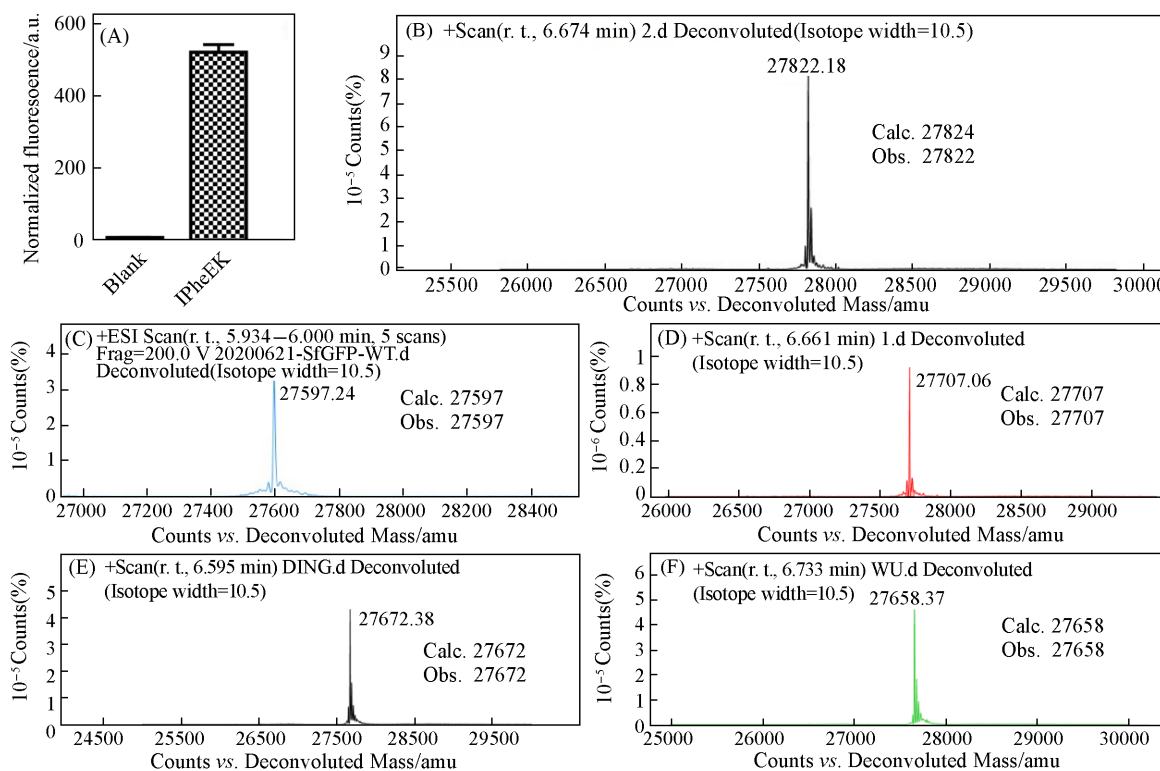
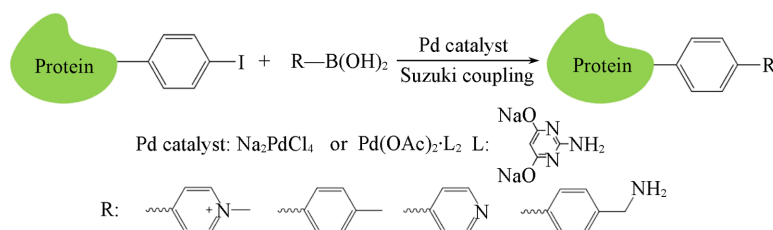


Fig. 1 IPheK incorporation with AVRS(A) and MS spectra of purified sfGFP-Y151-IPheK protein(B), sfGFP-wildtype protein(C), sfGFP-IPhe protein(D), sfGFP-BynK protein(E) and sfGFP-PynK protein(F)

根据文献[24, 25]报道的 MbpY1RS 突变体和蛋白质谱图 [图 1(C)~(F)] 验证了其余 3 种非天然氨基酸的正确插入, 为下一步的偶联反应实验提供了理论支持. 基于此, 针对蛋白质水上钯催化的偶联反应 (Scheme 2) 条件进行了优化.



Scheme 2 Schematic diagram of Suzuki coupling reaction(A)

## 2.2 蛋白质水平上钯催化偶联反应的条件优化

基于钯催化的偶联反应探索优化了客体分子偶联修饰到蛋白质特定位点的效率。首先, 针对 Suzuki 偶联反应, 选择 4-碘苯丙氨酸上的碘作为偶联单元进行研究, 催化剂参考文献[25]报道选用  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  或  $\text{Pd}(\text{OAc})_2 \cdot \text{L}_2$  (Scheme 2), 4 种带有硼酸官能团的小分子均为商品化试剂。反应体系组成如下: 50  $\mu\text{L}$  1 mg/mL GFP-Y151IPhe、1.9  $\mu\text{L}$  100 mmol/L 硼酸小分子、1.1  $\mu\text{L}$  50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  或 3  $\mu\text{L}$  10 mmol/L  $\text{Pd}(\text{OAc})_2 \cdot \text{L}_2$  及 6.5  $\mu\text{L}$  1 mol/L DTT。通过比较含有不同取代基的硼酸化合物的产率来探究是否可将带正电荷芳香基团的超分子基元修饰到蛋白上。

由质谱数据[图 2(A)~(D)]可见, 不带电荷的小分子可通过偶联反应修饰上去[图 2(B)], 然而带电荷的小分子的反应产率很低或者不能偶联[图 2(A), (C)和(D)]。其原因如下: (1) 因为 Suzuki 偶联的第一步是钯试剂与卤素原子发生螯合, 由于选择的卤素基团位于蛋白质表面的氨基酸侧链上, 当蛋白与钯试剂发生 Suzuki 偶联反应时高浓度条件下的螯合可能会发生副反应而导致副产物较多, 因此观察不到产物的生成; (2) 钯试剂的高金属价可能导致蛋白副反应较多。

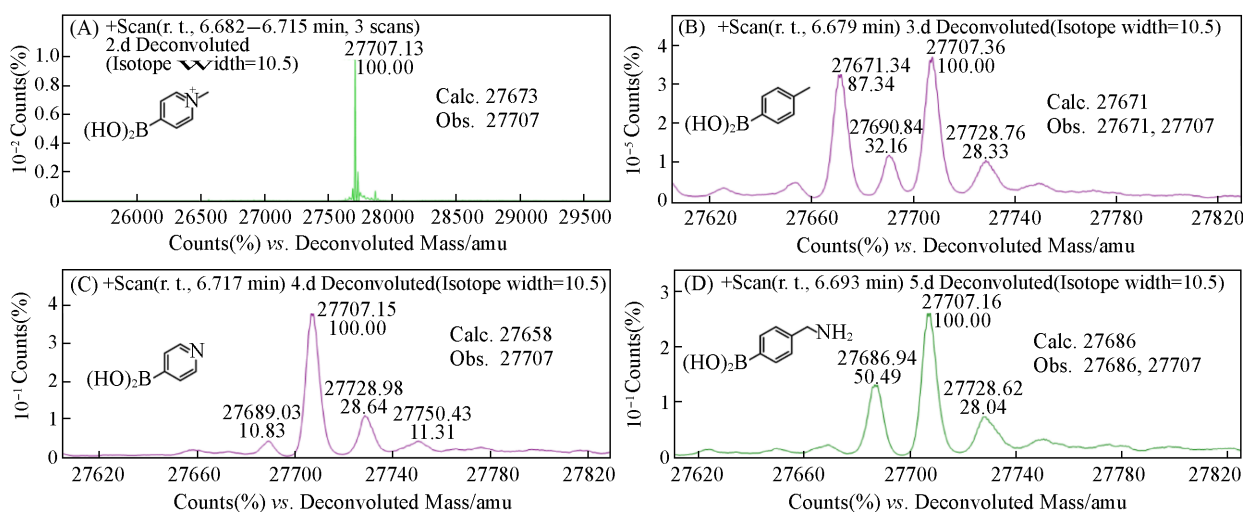
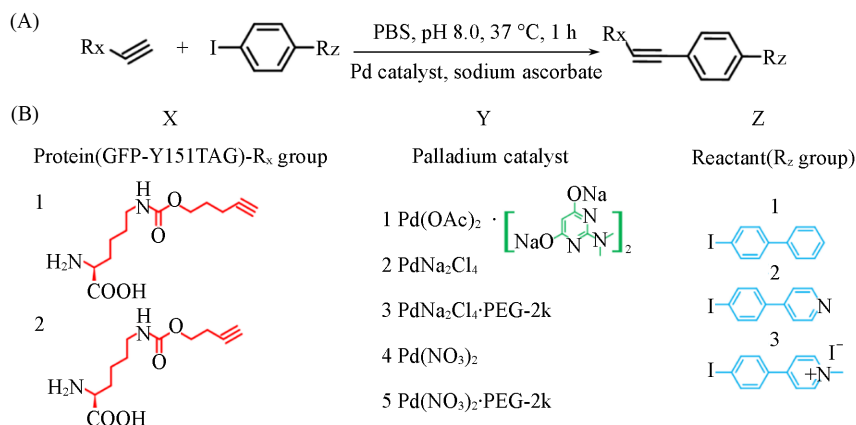


Fig. 2 MS spectra of Suzuki reaction of purified sfGFP-Y151IPhe protein with (1-methylpyridin-4-yl)boronic acid (B), *p*-tolylboronic acid (C), 4-pyridineboronic acid (D) and 4-(aminomethyl)phenylboronic acid (E)

基于以上实验结果, 选择 Sonogashira 偶联反应作为后续实验研究方向<sup>[31]</sup>。我们认为, 通过把卤素原子设计到客体分子上而不是蛋白质表面可以避免蛋白质与金属螯合所导致的大量副反应, 从而提高反应产率。

实验中首先通过合成或者直接购买带有碘的客体分子, 用于与蛋白质表面的非天然氨基酸带有的炔烃 (BynK 或 PynK) 发生 Sonogashira 偶联反应 [Scheme 3(A)], 而后从蛋白质的非天然氨基酸种类、催



Scheme 3 Schematic diagram of Sonogashira coupling reaction(A) and screening of reaction condition(B)

化剂种类以及反应小分子的种类3个方面优化了实验反应条件[Scheme 3(B)].

基于蛋白质谱及产率数据(见本文支持信息图S1和S2)可知,在5号催化剂[Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·PEG-2k]参与反应的情况下,多1个碳原子的PynK偶联上带正电荷的客体分子[Scheme 3(B)中小分子Z3]的产率更高.基于此,进一步从反应时间、温度和pH值等3个方面优化了偶联效率(见本文支持信息表S2).

实验结果(见本文支持信息图S3~S5)表明,在选择反应温度为30 °C, pH=8.0,反应时间为1 d的情况下,可以得到与化合物Z3发生完全偶联反应的产物(图3),但是仍可观察到一定量的客体分子多修饰副产物的生成.这可能是由于反应时间过长以及30 °C条件下长时间反应会导致蛋白质易发生副反应,故需要开发新的催化剂以获得更好的催化活性及特异性.

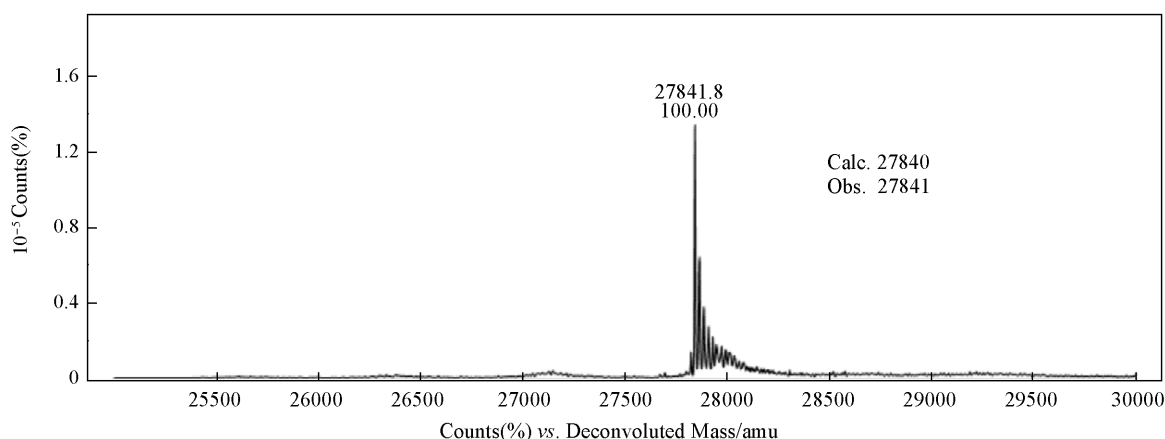


Fig. 3 Mass spectra of complete Sonogashira coupling reaction of purified sfGFP-Y151PynK protein

### 3 结 论

基于非天然氨基酸定点修饰技术,设计合成了一系列可通过钯催化偶联反应修饰超分子客体基元的非天然氨基酸,实现了该系列非天然氨基酸在大肠杆菌中的遗传编码以及在重组蛋白质中的精准插入;并通过钯催化的Suzuki和Sonogashira偶联反应进一步在重组蛋白的非天然氨基酸残基上修饰带有正电荷的吡啶分子,最终得到了基于位点特异性的超分子基元修饰的蛋白质.该方法可以实现任意蛋白的特定定位点的精确修饰,并且反应条件较为温和、可扩展性强.虽然该修饰方法的均一度和效率还有待进一步提高,但该工作为基于超分子化学进行蛋白生命科学研究提供了新思路和新方法.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240090>.

### 参 考 文 献

- [1] Neirynek P., Schimer J., Jonkheijm P., Milroy L. G., Cigler P., Brunsveld L., *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3(4), 539—545
- [2] Beshara C. S., Jones C. E., Daze K. D., Lilgert B. J., Hof F., *ChemBioChem*, **2010**, 11(1), 63—66
- [3] Hou C. X., Huang Z. P., Fang Y., Liu J. Q., *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15(20), 4272—4281
- [4] van Dun S., Ottmann C., Milroy L. G., Brunsveld L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(40), 13960—13968
- [5] Ma Y. L., Sun C., Li Z., Wang Z., Wei J., Cheng Q., Zheng L. S., Chang X. Y., Li K., Wang R., Jiang W., *CCS Chemistry*, **2022**, 4(6), 1977—1989
- [6] Pieters B. J. G. E., van Eldijk M. B., Nolte R. J. M., Mecinović J., *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45(1), 24—39
- [7] Zhang Y. M., Liu J. H., Yu Q. L., Wen X., Liu Y., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58(31), 10553—10557
- [8] Cao W. B., Qin X. W., Wang Y., Dai Z., Dai X. Y., Wang H. Y., Xuan W. M., Zhang Y. M., Liu Y., Liu T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(20), 11196—11200
- [9] Schreiber C. L., Smith B. D., *Nat. Rev. Chem.*, **2019**, 3(6), 393—400
- [10] Uhlenheuer D. A., Petkau K., Brunsveld L., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(8), 2817—2826
- [11] Smith A. A. A., Maikawa C. L., Roth G. A., Appel E. A., *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, 18(23), 4371—4375
- [12] Ekkebus R., van Kasteren S. I., Kulathu Y., Scholten A., Berlin I., Geurink P. P., de Jong A., Goerdayal S., Neeffjes J., Heck A. J. R., Komander D., Ovaa H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(8), 2867—2870

- [13] Maikawa C. L., Smith A. A. A., Zou L., Roth G. A., Gale E. C., Stapleton L. M., Baker S. W., Mann J. L., Yu A. C., Correa S., Grosskopf A. K., Liong C. S., Meis C. M., Chan D., Troxell M., Maahs D. M., Buckingham B. A., Webber M. J., Appel E. A., *Nat. Biomed. Eng.*, **2020**, *4*(5), 507—517
- [14] Assaf K. I., Alnajjar M. A., Nau W. M., *Chem. Commun.*, **2018**, *54*(14), 1734—1737
- [15] Biedermann F., Rauwald U., Zayed J. M., Scherman O. A., *Chem. Sci.*, **2011**, *2*(2), 279—286
- [16] Uhlenheuer D. A., Young J. F., Nguyen H. D., Scheepstra M., Brunsveld L., *Chem. Commun.*, **2011**, *47*(24), 6798—6800
- [17] Liu C. C., Schultz P. G., *Annu. Rev. Biochem.*, **2010**, *79*, 413—444
- [18] Luo X. Z., Fu G. S., Wang R. S. E., Zhu X. Y., Zambaldo C., Liu R. H., Liu T., Lyu X. X., Du J. T., Xuan W. M., Yao A. Z., Reed S. A., Kang M. C., Zhang Y. H., Guo H., Huang C. H., Yang P. Y., Wilson I. A., Schultz P. G., Wang F., *Nat. Chem. Biol.*, **2017**, *13*(8), 845—849
- [19] Tang H. T., Dai Z., Qin X. W., Cai W. K., Hu L. M., Huang Y. J., Cao W. B., Yang F., Wang C., Liu T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*(41), 13253—13259
- [20] Ling X. Y., Chen H. Q., Zheng W., Chang L. Y., Wang Y., Liu T., *Chinese Chem. Lett.*, **2020**, *31*(1), 163—166
- [21] Spicer C. D., Triemer T., Davis B. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*(2), 800—803
- [22] Davis L., Chin J. W., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2012**, *13*(3), 168—182
- [23] Gao Z. H., Gouverneur V., Davis B. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*(37), 13612—13615
- [24] Li J., Lin S. X., Wang J., Jia S., Yang M. Y., Hao Z. Y., Zhang X. Y., Chen P. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*(19), 7330—7338
- [25] Dumas A., Spicer C. D., Gao Z. H., Takehana T., Lin Y. Y. A., Yasukohchi T., Davis B. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*(14), 3916—3921
- [26] Dai Z., Tan L., Su Y., Zhao K., Tian Y., Liu Y., Liu T., *Chinese Chem. Lett.*, **2024**, *35*(5), 109121
- [27] Spicer C. D., Davis B. G., *Nat. Commun.*, **2014**, *5*, 4740
- [28] Rüsner D., Schneider T., Schneider D., Scheffner M., Marx A., *Nat. Protoc.*, **2015**, *10*(10), 1594—1611
- [29] Wang Y., Zhang J. M., Han B. Y., Tan L. Z., Cai W. K., Li Y. X., Su Y. Y., Yu Y. T., Wang X., Duan X. J., Wang H. Y., Shi X. M., Wang J., Yang X., Liu T., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*(1), 974
- [30] Jang H. S., Jana S., Blizzard R. J., Meeuwssen J. C., Mehl R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(16), 7245—7249
- [31] Li N., Lim R. K., Edwardraja S., Lin Q., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*(39), 15316—15319

(Ed.: L, W, K)