

l i n k e r

# 连接子的应用及设计

A p p l i c a t i o n a n d d e s i g n o f l i n k e r

汇报人：井维娜

日期：2021.12.30

# 目录 / CONTENTS

01

—

定义及应用

02

—

分类

03

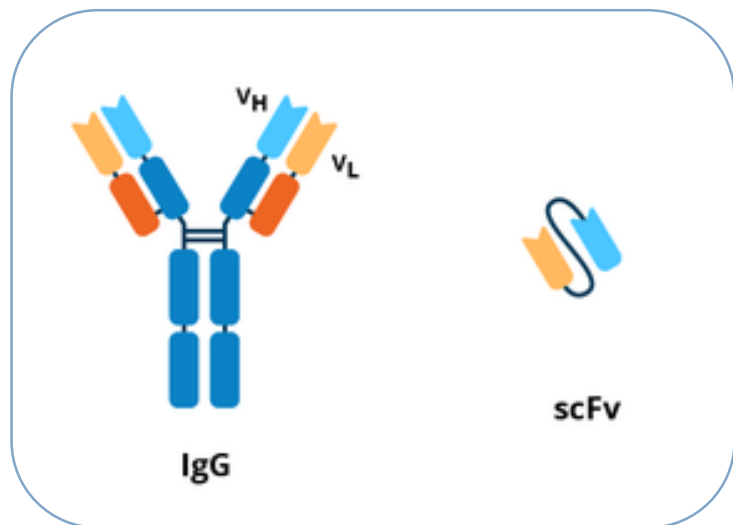
—

融合蛋白linker

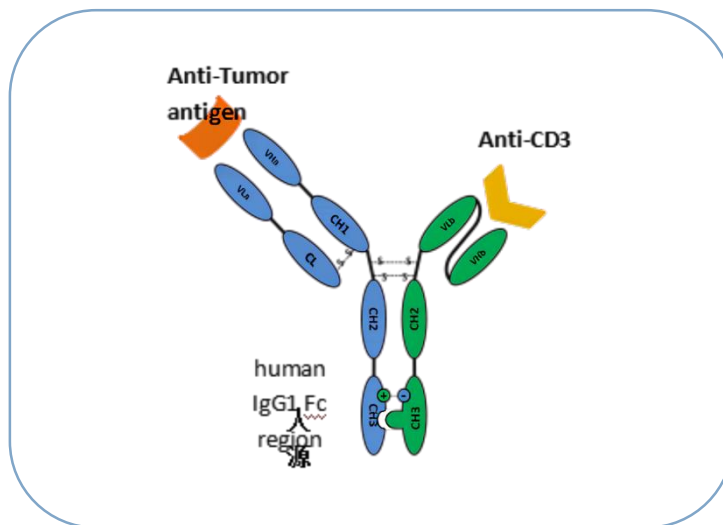
# 1 定义及应用

# 定义及应用

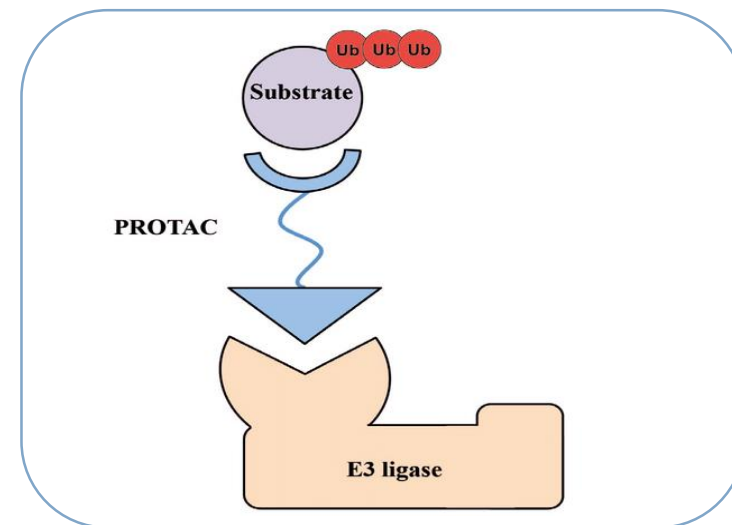
Definition and Application



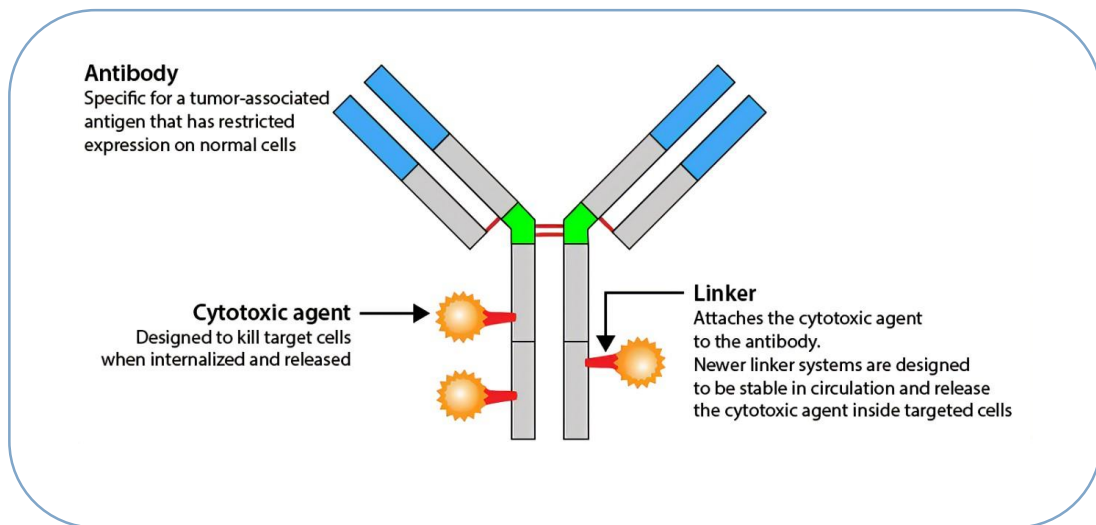
(1) 单链抗体



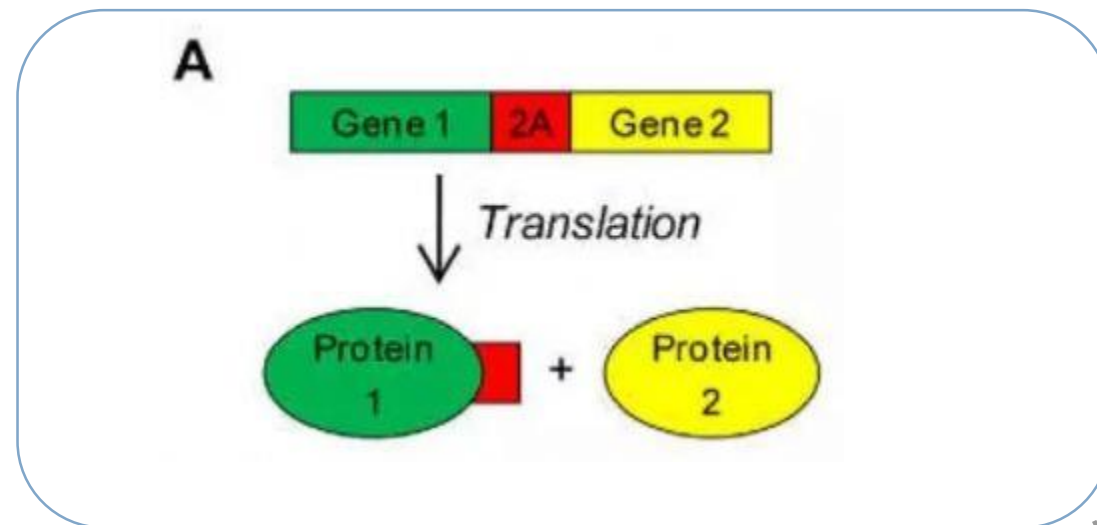
(2) 双特异性抗体



(3) PROTAC



(4) ADC



(5) 基因编辑

# 定义及应用

Definition and Application

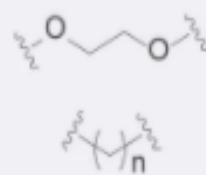
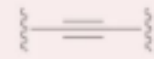
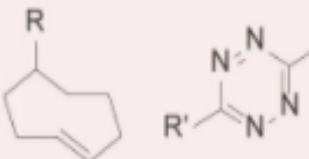
linker

连接物：用于连接两个主体。

连接子：用于连接由单个启动子驱动的多个ORF同时表达（基因表达载体元件）

连接肽：两个功能蛋白分子之间的接头序列（氨基酸肽链）。

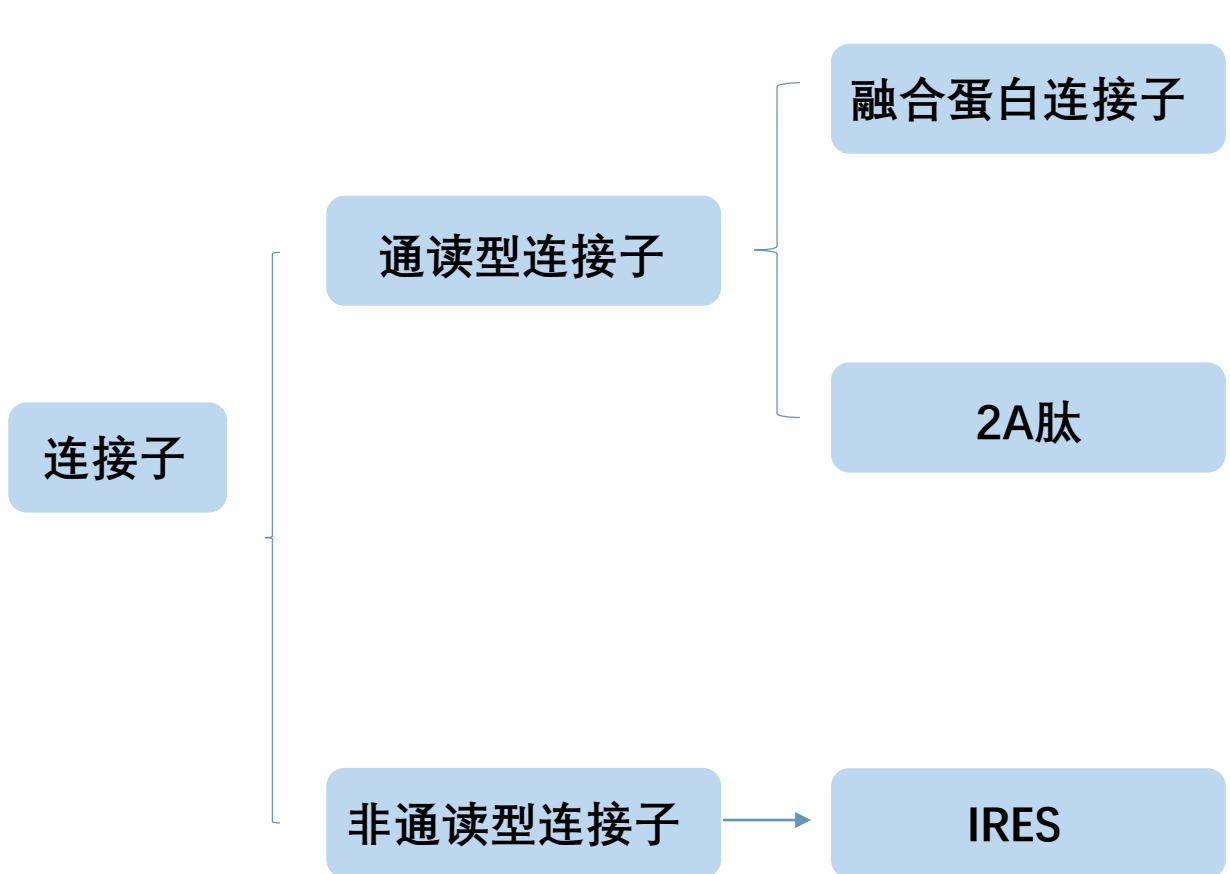
Linker最早是由Bird (1988) 和Huston (1988) 提出，而连接物通常由甘氨酸 (Gly, G) 和丝氨酸 (Ser, S) 残基组成。

结构	类型
	烷基/PEG
	刚性基团
	点击化学基团
	CLIPTACs
	光转换基团

PNAS, 1988, 85(16): 5879-5883

Science, 1988, 242(4877): 423-426.

## 2 linker分类



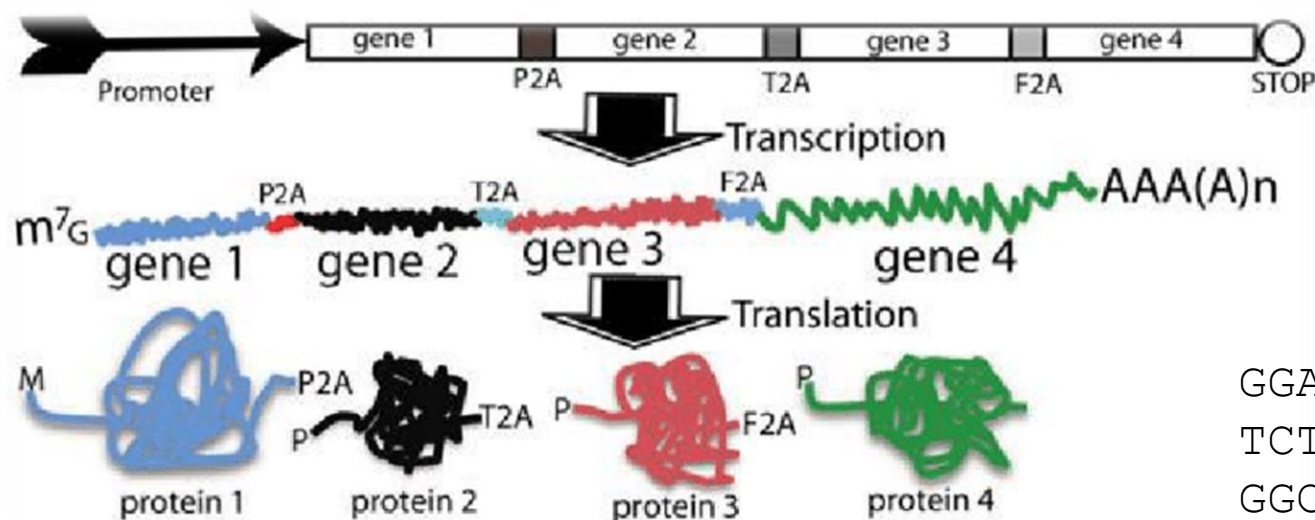
2A肽是来源于病毒的短肽（18-25个氨基酸），它们通常被称为“自我剪切”肽，能使一条转录产物产生多种蛋白。通过使核糖体跳过2A元件C-末端的甘氨酸和脯氨酸肽键的合成而发挥作用，最终导致2A序列末端和下游产物分离。其中，上游蛋白的C端将会添加一些额外的2A残基，而下游蛋白的N端将会有额外的脯氨酸。目前有四种常用的2A肽，分别是P2A，T2A，E2A和F2A，来源于四种不同的病毒。

**内部核糖体进入位点序列(Internal ribosome entry site)**，来源于脑心肌炎病毒（EMCV）。基因5'端具有的一段较短的**RNA序列**（约150-250BP），能折叠成类似于起始tRNA的结构，从而介导核糖体与RNA结合，起始蛋白质翻译。  
 作为额外的核糖体募集位点，允许在除了翻译起始位点之外的mRNA内部区域发生翻译。

# 分类

classify

## 2A肽



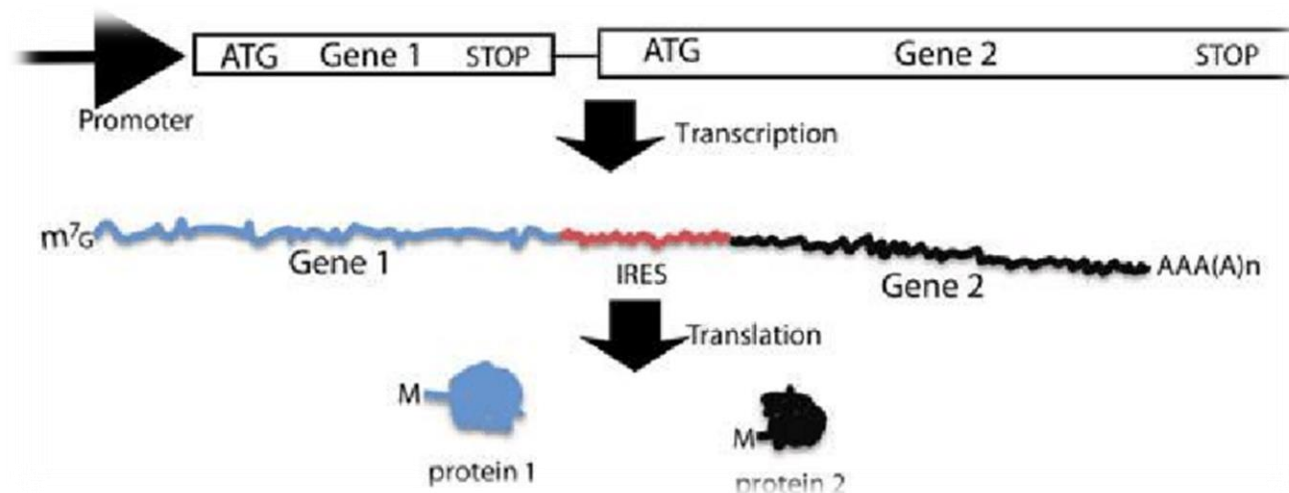
- —D—x—E—x—N—P—G—P序列
- 会在上下游ORF留下附加残基
- 2A肽前一个ORF的没有终止密码子

### 例：F2A

```
GGAAGCGGAGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCT  
TCTGAAGTTGGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCCTG  
GGCCC
```

PLoS One. 6:e18556 (2011)

## IRES

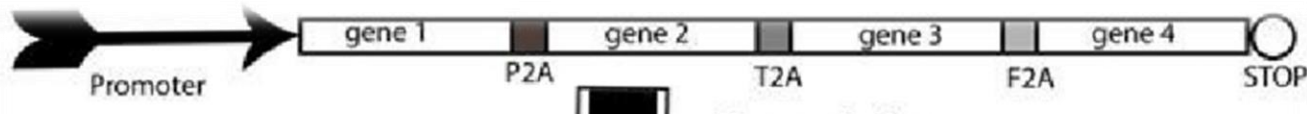


- IRES前一个ORF需要有终止密码子
- IRES的主要缺点是与上游ORF相比，下游ORF的表达水平比较低（通常为上游的10%-20%）

# 分类

classify

## 2A肽



●会在上下游ORF留下附加残基

名称: IRES

描述: Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site

应用注释:

Recruits ribosome to initiate translation internally on a transcript independent of its 5' end. Multiple proteins can be made from a polycistronic transcript containing multiple ORFs separated by IRES.

类型: Linker

亚型: Non-read-through

参考文献: [Biotechniques. 41:283 \(2006\)](#)

序列 (Length: 588 bp)

```

1  GCCCCTCTCC CTCCCCCCC CCTAACGTTA CTGGCCGAAG CCGCTTGAA TAAGGCCGGT GTGCGTTTGT CTATATGTTA TTTTCCACCA TATTGCCGTC
101 TTTTGGCAAT GTGAGGGCCC GGAAACCTGG CCCTGTCTTC TTGACGAGCA TTCCTAGGGG TCTTTCCCCT CTCGCCAAAG GAATGCAAGG TCTGTTGAAT
201 GTCGTGAAGG AAGCAGTTC TCTGGAAGCT TCTTGAAGAC AAACAACGTC TGTAGCGACC CTTTGCAGGC AGCGGAACCC CCCACCTGGC GACAGGTGCC
301 TCTGCGGCCA AAAGCCACGT GTATAAGATA CACCTGCAAA GGCGGCACAA CCCCAGTGCC ACGTTGTGAG TTGGATAGTT GTGGAAAGAG TCAAATGGCT
401 CTCCTCAAGC GTATTCAACA AGGGGCTGAA GGATGCCCAG AAGGTACCC ATTGTATGGG ATCTGATCTG GGGCCTCGGT ACACATGCTT TACATGTGTT
501 TAGTCGAGGT TAAAAAACG TCTAGGCCCC CCGAACCACG GGGACGTGGT TTTCTTTGA AAAACACGAT GATAATATGG CCACAACC

```

## IRES

密码子

TTGACCT

TACCCTG

18556 (2011)

密码子

F相比,

通常为

上游的10%-20%)



# 3 融合蛋白linker

融合蛋白：DNA重组技术得到的两个基因重组后的表达产物，通过**基因融合**两个或多个**蛋白结构域**，可使融合蛋白取得各组成部分的衍生功能，两个功能**蛋白**分子之间通过**连接肽**连接。

## 天然连接肽的性质

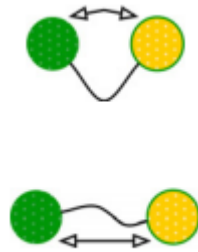
天然融合蛋白需要linker连接两个或多个功能域，George等对天然连接肽进行总结。

- 连接肽长度变化很大，一般**6-59**个氨基酸；、根据连接肽的长度将其分为**大型**连接肽(残基数： $21\pm 7.6$ )、**中型**连接肽(残基数： $9.1\pm 2.4$ )、**小型**连接肽(残基数： $4.5\pm 0.7$ )
- 苏氨酸(T)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)、甘氨酸(G)、谷氨酸 (E)、天冬氨酸(N)、赖氨酸(K)、谷氨酰胺(Q)、丙氨酸(A)、精氨酸 (R)是较好的linker组分。
- **脯氨酸 (P)** 出现频率最高，提高刚性和结构独立性；**苏氨酸 (T)**、**丝氨酸 (S)**、**甘氨酸 (G)**，体积小提高灵活性。

# 融合蛋白linker

fusion protein Linker

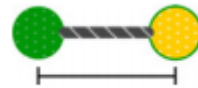
## 柔性连接肽



连接的功能域之间需要一定相互作用。一般由小的非极性氨基酸（甘氨酸）或者极性氨基酸（丝氨酸或苏氨酸）组成。甘氨酸能提供柔性，丝氨酸和苏氨酸可以与水分子形成氢键，保证水溶液中的稳定性。

**典型例子：**GS连接肽 (GGGGS)  $n$  ( $n \leq 6$ )  
Thr和Ala, 提高灵活度; Lys和Glu, 提高溶解度

## 刚性连接肽



分离功能域，保持一定间隔；由容易形成稳定二级结构的氨基酸残基组成。刚性连接肽形成 $\alpha$ -螺旋。

**典型例子：**(EAAAK)  $n$  ( $n \leq 6$ ) ; (XP) $n$ , X为任意一种氨基酸（丙、赖、谷）

## 可裂解连接肽



在体内会被降解，释放出游离的功能域。可以减少空间位阻，提高生物活性。

**典型例子：**二硫键, 蛋白酶裂解

Examples of linkers and their functionalities.

Linker function	Examples	Linker		Ref.	
		Fusion protein	Type		Sequence <sup>a</sup>
Increase stability/folding	scFv		Flexible	(GGGGS) <sub>3</sub>	[46]
	G-CSF-Tf		Flexible	(GGGGS) <sub>3</sub>	[20]
	HBsAg preS1		Flexible	(GGGGS) <sub>3</sub>	[85]
	Myc-Est2p		Flexible	(Gly) <sub>8</sub>	[30]
	Albumin-ANF		Flexible	(Gly) <sub>6</sub>	[31]
	Virus coat protein		Rigid	(EAAAK) <sub>3</sub>	[50]
	Beta-glucanase-xylanase		Rigid	(EAAAK) <sub>n</sub> (n = 1-3)	[52]
	Increase expression	hGH-Tf and Tf-hGH		Rigid	A(EAAAK) <sub>4</sub> ALEA(EAAAK) <sub>4</sub> A
G-CSF-Tf and Tf-G-CSF			Rigid	A(EAAAK) <sub>4</sub> ALEA(EAAAK) <sub>4</sub> A	[18]
Improve biological activity	G-CSF-Tf		Flexible	(GGGGS) <sub>3</sub>	[20]
	G-CSF-Tf		Rigid	A(EAAAK) <sub>4</sub> ALEA(EAAAK) <sub>4</sub> A	[20]
	hGH-Tf		Rigid	A(EAAAK) <sub>4</sub> ALEA(EAAAK) <sub>4</sub> A	[40]
	HSA-IFN- $\alpha$ 2b		Flexible	GGGGS	[17]
	HSA-IFN- $\alpha$ 2b		Rigid	PAPAP	[17]
	HSA-IFN- $\alpha$ 2b		Rigid	AEAAAKEAAAKA	[17]
	PGA-rTHS		Flexible	(GGGGS) <sub>n</sub> (n = 1, 2, 4)	[55]
	Interferon- $\gamma$ -gp120		Rigid	(Ala-Pro) <sub>n</sub> (10-34 aa)	[54]
	GSF-S-S-Tf		Cleavable	Disulfide	[39]
	IFN- $\alpha$ 2b-HSA		Cleavable	Disulfide	[42]
Enable targeting	FIX-albumin		Cleavable	VSQTSKLTR↓AETVFPDV <sup>b</sup>	[59]
	LAP-IFN- $\beta$		Cleavable	PLG↓LWA <sup>c</sup>	[64]
	MazE-MazF		Cleavable	RVL↓AEA; EDVVCC↓SMSY; GGIEGR↓GS <sup>d</sup>	[68]
	Immunotoxins		Cleavable	TRHRQPR↓GWE; AGNRVRR↓SVG; RRRRRR↓R↓R <sup>e</sup>	[72]
	Immunotoxin		Cleavable	GFLG↓ <sup>f</sup>	[77]
Alter PK	G-CSF-Tf and hGH-Tf		Dipeptide	LE	[79]
			Rigid	A(EAAAK) <sub>4</sub> ALEA(EAAAK) <sub>4</sub> A	
			Cleavable	Disulfide	

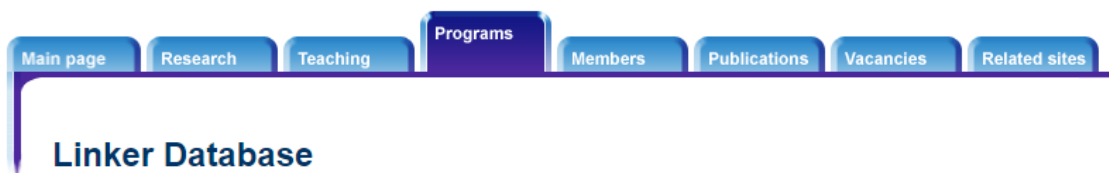
**连接肽的设计** 设计原理:

- (1) 各个功能蛋白活性中心互相远离
- (2) 多肽链不互相影响, 也不互相折叠缠绕
- (3) 考虑蛋白质的折叠、表达、纯化

考虑因素:

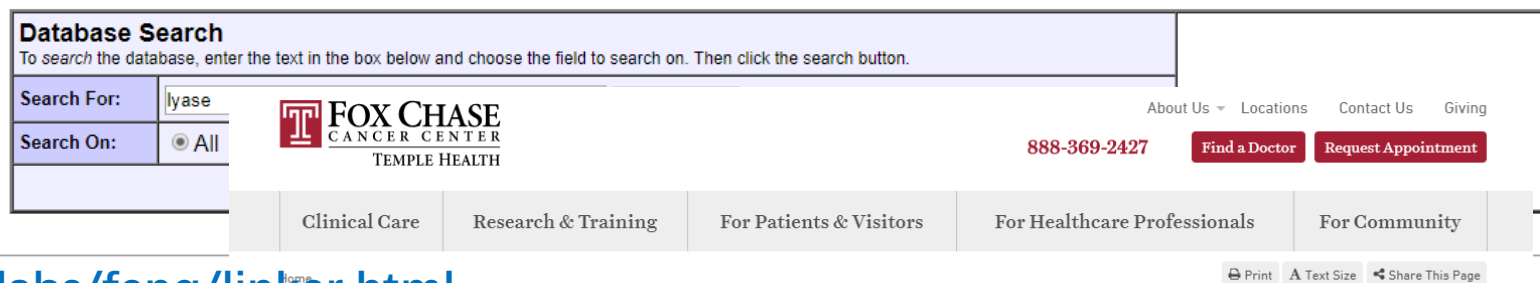
- (1) linker长度
- (2) 结构
- (3) 常见氨基酸 (G、S、P)
- (4) 内部核苷酸序列

设计工具和数据库



<http://www.ibi.vu.nl/programs/linkerdbww>

George—1280个天然linker



<http://www.fccc.edu/research/labs/feng/linker.html>

**Reference:** George RA. and 879.

**Linkers for gene fusion**

## Page Not Found

The page you're looking for isn't available, or may have moved.

To better serve you, here are some helpful links:

- ▶ [Return to Home Page](#)
- ▶ [Cancer Types & Conditions](#)
- ▶ [Contact Us](#)
- ▶ [MyFoxChase Login](#)
- ▶ [Locations](#)
- ▶ [Find a Doctor](#)
- ▶ [Request an Appointment](#)
- ▶ [Careers](#)

Thanks!