

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01333

多肽修饰的纳米金加速油-水界面酶促反应

杨小超^{1,2} 莫志宏^{*1,2,3}

(重庆大学生物工程学院¹, 新型微纳器件与系统技术国家重点学科实验室², 化学化工学院³, 重庆 400044)

摘 要 用固相合成法制备阳离子氨基酸组成的多肽, 再将其连接到巯基化合物上, 用于纳米金表面配体交换, 制备阳离子多肽修饰的纳米金, 并研究了这种纳米粒子对油-水(O/W)乳液界面酶促反应速度的影响。结果发现, 将含有荧光底物的乳滴同酶直接混合时, 45 min 内溶液中未检测到荧光信号变化, 但向该溶液中加入纳米粒子后溶液中荧光信号立即增强。出现该现象的主要原因是, 当乳液界面酶促反应体系中含有纳米粒子时, 纳米粒子表面的阳离子多肽同时吸附带负电荷的酶和乳液, 迅速屏蔽酶与乳液之间的电荷排斥, 使酶与乳液中的底物能有效接触, 加速酶促反应进行; 通过选用不同的油相制备乳液, 调控纳米粒子与乳液之间的氢键作用, 还可使酶促反应速度进一步提高。

关键词 纳米金; 酶促反应; 乳液; 界面

1 引 言

纳米金具有抗氧化性强、生物相容性好、制备方法简单等优点, 它是一种研究最广泛的纳米粒子^[1,2]。金和巯基之间可以形成稳定的共价键, 用含巯基的化合物修饰纳米金表面, 可以得到稳定性很好的纳米粒子。近年来, 用两相合成法制备约 2 nm 的纳米金^[3], 并用配体交换法^[4]对其表面进行单分子层修饰, 制备功能性纳米金的方法备受关注, 其原因主要是这种纳米粒子的粒度与许多生物大分子相近, 并且具有相当大的比表面积, 进行适当的修饰后能与生物分子发生强烈的吸附作用, 是研究纳米粒子和生物分子相互作用的理想材料。目前, 这类单分子层修饰的小粒度纳米金已经应用于蛋白质-蛋白质吸附的阻断^[5]、 α -螺旋识别^[6]、变性蛋白质构象恢复^[7]及生物转运^[8]等领域的研究。

酶是一类具有催化功能的生物大分子。酶促反应具有高度的化学专一性、立体选择性和位置选择性^[9~11]。酶促反应在工业生产中, 特别是食品、药品和环境化学领域有重要用途。由于工业生产中许多酶促反应的底物为脂溶性物质, 因此这些酶促反应需要在油-水界面进行, 其中脂肪酶是一种在油-水界面执行酶促反应使用最多的酶, 它可以催化脂类水解、脂类合成和手性化合物拆分等化学反应, 该酶在油-水界面具有最大活性^[12,13]。脂肪酶为水溶性生物分子, 要使该酶均匀分散于油-水界面执行催化功能, 需对其进行化学修饰, 常用的方法为在酶表面修饰聚合物, 其中以聚乙二醇研究最多^[14], 但对酶进行共价修饰容易造成酶的构象发生改变, 从而影响酶的活性。本研究制备了一种阳离子多肽巯基配体, 通过配体交换法将其用于粒度约为 2 nm 的纳米金的表面单分子层修饰, 得到了阳离子多肽修饰的纳米金, 并研究了这种纳米粒子对油-水(O/W)乳液界面酶促反应的影响。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF, Bruker Daltonics 公司); 100CX 透射电子显微镜(JEOL); SpectraMax M5 酶标仪(Spectramax); Zeta 电位仪(Malvern Zetasizer Nano ZS)。

脂肪酶(*Candida antarctica*)及其底物 4-甲基伞形酮(Sigma-Aldrich 公司); 三苯基保护的巯基化合物 Trit-S-C11-PEG-COOH 按文献^[8]的方法制备, 其结构如图 1 所示。戊硫醇保护的粒径约为 2 nm 的纳米金采用两相合成法制备^[3]。多肽固相合成所需试剂包括哌啶、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、*N,N*-二

2009-12-18 收稿; 2010-03-02 接受

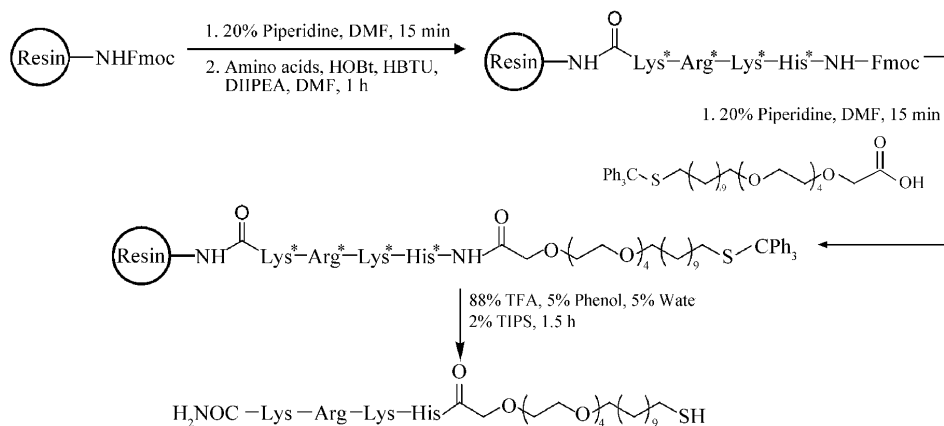
本文系国际科技合作项目(No. 20072664)资助

* E-mail: zhihmo@cqu.edu.cn

异丙基乙胺 (DIPEA)、苯酚、三氟乙酸 (TFA)、三异丙基硅烷 (TIPS)、*N,N'*-二异丙基碳二亚胺 (DIC) 等, 均购自 Advanced ChemTech 公司; 其它试剂均为分析纯; 实验用水为超纯水 ($>16 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

2.2 多肽巯基配体的合成

多肽以标准的 Fmoc 固相合成法制备^[15], 其序列如图 1 所示。组氨酸、精氨酸和赖氨酸的侧链保护基团分别为 Trt、Pmc 和 Boc。多肽合成时树脂/氨基酸/HOBt/HTBU/DIPEA 的摩尔比为 1:5:5:5:10。多肽合成完毕后通过氨基和羧基的缩合将其与 Trit-S-C11-TEG-COOH 联接在一起, 形成多肽巯基配体, 其操作步骤如图解 1 所示。Trit-S-C11-TEG-COOH 与多肽缩合时, 树脂/Trit-S-C11-TEG-COOH/DIC/HOBt 的摩尔比为 1:5:6:7.5。缩合反应完成后用含三氟乙酸的切割试剂除去氨基酸侧链保护基团, 并同时多肽从树脂上切割下来, 将产物置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 的乙醚中沉淀洗涤, 最后离心分离。

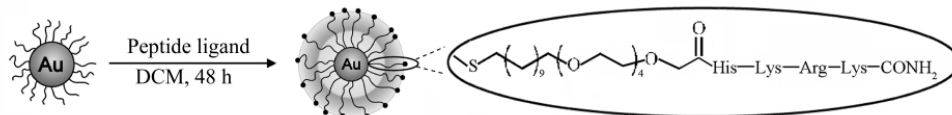


图解 1 多肽配体合成示意图 (* 指侧链保护基团)

Scheme 1 Scheme for peptide ligand synthesis (* indicates protected side chains)

2.3 配体交换制备多肽修饰的纳米金

多肽修饰的纳米金按配体交换的方法制备, 如图解 2 所示, 具体操作步骤为: 取 10 mg 戊硫醇保护的



图解 2 纳米金表面配体交换反应

Scheme 2 Place-exchange reaction on gold nanoparticle surface

的纳米金, 溶解于 10 mL 蒸馏后的二氯甲烷中, 通氮气 10 min 以除去溶液中的氧气后, 将 30 mg 阳离子多肽配体溶解在 1 mL 甲醇, 并加入纳米金中, 通氮气 5 min 后密闭, 于室温搅拌 48 h, 旋转蒸发溶剂后用二氯甲烷清洗 5 次, 在半透膜中渗透 12 h, 最后分散于蒸馏水中。

2.4 纳米金介导 O/W 乳液界面脂肪酶催化脂的水解反应

将 4-甲基伞形酮分别溶解在油醇和油酸中, 使其浓度均为 2 g/L; 取 5 μL 含有底物的油醇和油酸, 分别于 1 mL 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中搅拌, 使其乳化得到含有底物的 O/W 乳液; 取 10 μL 上述乳液与 100 nmol/L 脂肪酶混合于 96 孔微孔板中, 加入不同浓度的纳米粒子, 溶液最终体积为 200 μL 。在酶标仪上以 370 nm 为激发波长, 450 nm 为发射波长, 5 min 为时间间隔, 读取酶促反应产物的荧光发射强度。

3 结果与讨论

3.1 多肽巯基配体的设计原理

本研究中用于修饰纳米金的多肽巯基配体由 HS-C11-TEG-COOH 和 His-Lys-Arg-Lys 两部分组成。选择 HS-C11-TEG-COOH 原因是: 该化合物中含有巯基、 $\text{C}_{11}\text{H}_{22}$ 和乙二醇的四聚体, 这 3 种功能团在纳米

粒子的修饰中可分别起到同共价连接纳米金、稳定金核和减少生物分子非特异性吸附的作用^[16]。用 3 种带正电荷的氨基酸合成多肽的目的是使阳离子氨基酸组成的多肽带正电荷,屏蔽酶和乳液之间的负电荷排斥;多肽末端的氨基可与羧基形成氢键作用,特别是精氨酸可与羧基形成 5 个氢键^[17],纳米粒子通过氢键作用可将酶稳定的吸附到乳液表面。

3.2 多肽巯基配体的表征

采用 MALDI-TOF-MS 法对多肽巯基配体的表征结果如图 1 所示。配体的理论分子量为 986.6,质谱分析得到的分子量为 987.6,实验值比理论值多 1。这是由于在激光电离过程中形成了 $[M + H]^+$ 。质谱分析结果表明,本法制得的多肽巯基配体纯度高。

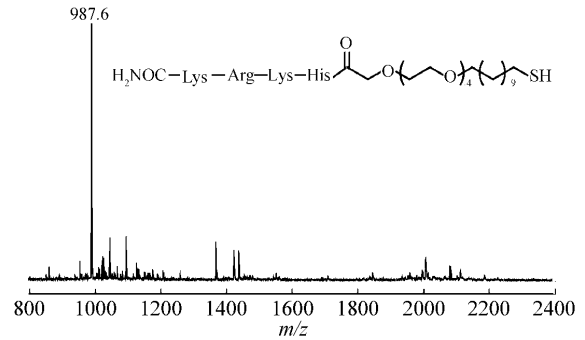


图 1 多肽巯基配体的 MALDI-TOF 图谱

Fig. 1 MALDI-TOF mass spectra of synthesized peptide-thiol ligand

3.3 纳米粒子和乳液的表征

TEM 观测结果显示,纳米粒子粒度约为

2 nm。纳米粒子的 Zeta 电位为 +32 mV,油醇和油酸乳液的 Zeta 电位分别为 -52 和 -67 mV,纳米粒子表面带正电荷,两种乳液表面均带负电荷;乳液的粒度用动态光散射进行测量,油醇和油酸乳液具有相似的粒度,分别为 220 和 190 nm。

3.4 纳米粒子屏蔽电荷排斥加速脂肪酶催化脂的水解反应

在含有底物的油醇乳液中加入脂肪酶,45 min 内溶液中未见明显荧光变化(图 2)。两相不相溶的乳液体系中,由于油和水介电常数的差异,水解离所产生的 OH^- 吸附在乳液表面,使乳液表面带负电荷^[18],Zeta 电位测量结果与该理论相符;脂肪酶等电点为 5.6,在 pH 7.4 的缓冲液中该酶表面同样带负电荷,乳液与酶之间的电荷排斥使得酶与底物不能有效接触,造成酶促反应速度缓慢。但加入纳米粒子后溶液中立即出现荧光信号,并且随着纳米粒子浓度增加,荧光信号也随之增强。出现这种结果的原因是,纳米粒子表面的阳离子多肽配体同时吸附带负电荷的酶和乳液,迅速屏蔽酶与乳液之间的电荷排斥,使酶与乳液中的底物能有效接触,加速酶促反应进行。

3.5 纳米粒子与乳液形成氢键加速脂肪酶催化脂的水解反应

多肽中的末端氨基能与羧基形成较强的氢键,特别是精氨酸中的胍基能与羧基形成 5 个氢键^[17]。基于该原理,本实验采用分子结构与油醇类似的油酸为乳液的油相,考察了纳米粒子表面多肽配体与乳液之间的氢键作用对油-水界面酶促反应的影响(图 3)。由图 3 可见,在无纳米粒子时,45 min 内未见

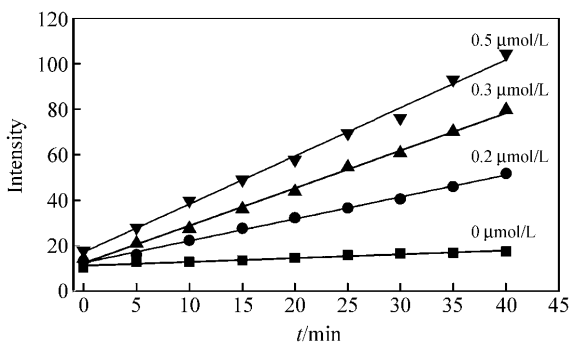


图 2 纳米粒子介导脂肪酶在油醇乳液界面水解底物引起荧光强度发生变化

Fig. 2 Fluorescence change of substrate hydrolyzed by lipase at oleic alcohol emulsion interface mediated by nanoparticles

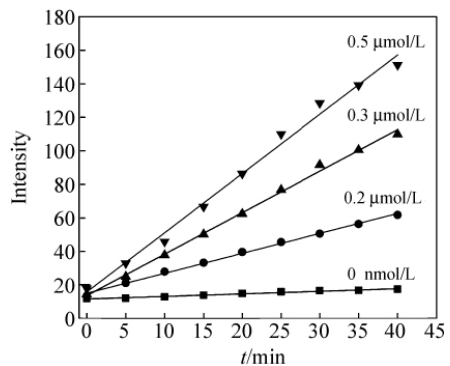


图 3 纳米粒子介导脂肪酶在油酸乳液界面水解底物引起荧光强度发生变化

Fig. 3 Fluorescence change of substrate hydrolyzed by lipase at oleic acid emulsion interface mediated by nanoparticles

溶液荧光明显变化; 随着纳米粒子的加入和浓度增加, 荧光信号迅速增强, 并且荧光信号增强的速度明显高于油醇乳液。这是由于纳米粒子表面的多肽与油酸末端的羧基形成了强烈的氢键, 将纳米粒子稳定的吸附到乳液表面, 同时也使酶与底物的接触更为充分, 进一步提高了乳液界面酶促反应速度。

References

- 1 Ghosh P, Han G, De M, Kim C K, Rotello V M. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2008**, 60(11): 1307 ~ 1315
- 2 Rosi N L, Mirkin C A. *Chem. Rev.*, **2005**, 105(4): 1547 ~ 1562
- 3 Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin D J, Whyman R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, (7): 801 ~ 802
- 4 Hostetler M J, Green S J, Stokes J J, Murray R W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118(17): 4212 ~ 4213
- 5 Bayraktar H, Ghosh P S, Rotello V M, Knapp M J. *Chem. Commun.*, **2006**, (13): 1390 ~ 1392
- 6 Ghosh P S, Verma A, Rotello V M. *Chem. Commun.*, **2007**, (27): 2796 ~ 2798
- 7 De M, Rotello V M. *Chem. Commun.*, **2008**, (30): 3504 ~ 3506
- 8 Ghosh P S, Kim C-K, Han G, Forbes N S, Rotello V M. *ACS Nano*, **2008**, 2(11): 2213 ~ 2218
- 9 Zenkin N, Yuzenkova Y, Severinov K. *Science*, **2006**, 313(5786): 518 ~ 520
- 10 Shevelev I V, Hubscher U. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2002**, 3(5): 364 ~ 376
- 11 Jaeger K E, Eggert T. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, 15(4): 305 ~ 313
- 12 Desnuelle P, Sarda L, Ailhaud G. *Biochim. Biophys. Acta*, **1960**, 37(3): 570 ~ 571
- 13 Sarda L, Desnuelle P. *Biochim. Biophys. Acta*, **1958**, 30(3): 513 ~ 521
- 14 Castro G R, Knubovets T. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2003**, 23(3): 195 ~ 231
- 15 Ghosh P, Yang X-C, Zhu Z-J, Agasti S S, Mo Z-H, Rotell V M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132(8): 2642 ~ 2645
- 16 You C C, Miranda O R, Gider B, Ghosh P S, Kim I B, Erdogan B, Krovci S A, Bunz U H F, Rotello V M. *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, 2(3): 318 ~ 323
- 17 Borders C L, Broadwater J A, Bekeny P A, Salmon J E, Lee A S, Eldridge A M, Pett V B. *Protein Sci.*, **1994**, 3(4): 541 ~ 548
- 18 Kamogawa K, Akatsuka H, Matsumoto M, Yokoyama S, Sakai T, Sakai H, Abe M. *Colloids Surf. A*, **2001**, 180(1-2): 41 ~ 53

Peptide Functionalized Gold Nanoparticle for Facilitation of Enzymatic Reaction at Oil-Water Interface

YANG Xiao-Chao^{1,2}, MO Zhi-Hong^{*1,2,3}

(College of Bioengineering¹, National Key Laboratory for Novel Micro/nano Device and System Technology²,
College of Chemistry and Chemical Engineering³, Chongqing University, Chongqing 400044)

Abstract Cationic peptide composed of positively charged amino acids was synthesized by solid phase method and conjugated to thiolated compound. Gold nanoparticle was functionalized with the synthesized peptide ligand using place-exchange reaction. The effect of the peptide functionalized gold nanoparticle on the lipase catalyzed hydrolysis of hydrophobic ester substrate at O/W emulsion interface was investigated. The fluorescent substrate contained oil was emulsified in buffer and mixed with enzyme. The results indicated that the fluorescence kept unchanged within 45 min. However, the fluorescence immediately increased after adding nanoparticles, which indicated that the enzymatic reaction speed at O/W emulsion interface was significantly increased in the presence of peptide modified gold nanoparticles. The reason for the enzymatic reaction speed increase was supposed to be the conjugation of both emulsion and enzyme to the nanoparticles, which screened the charge repulsion between the emulsion and enzyme. Furthermore, the enzymatic reaction at O/W emulsion interface could be controlled by using oil with different hydrogen bonding ability.

Keywords Nanoparticle; Enzymatic reaction; Emulsion; Interface

(Received 18 December 2009; accepted 2 March 2010)