

蜂毒素在功能化金纳米粒子表面的 吸附及构象变化

王 磊, 党永强, 张 敏, 孙 健, 吴玉清
(吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室, 长春 130012)

摘要 利用硼氢化钠还原法制备了金纳米粒子, 通过在其表面修饰链长不同的巯基羧酸, 得到了功能化纳米粒子. 利用荧光发射、紫外吸收和圆二色谱等手段研究了功能化金纳米粒子与蜂毒素分子之间的相互作用及其所诱导的蛋白质分子的构象变化. 研究表明, 功能化修饰的金纳米粒子可通过静电相互作用吸附蜂毒素 (Melittin) 并诱导其 α -螺旋结构的形成, 且这种效应与巯基羧酸分子的链长直接相关.

关键词 功能化金纳米粒子; 蜂毒素; α -螺旋结构

中图分类号 O647.3; O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)01-0135-05

功能化的金纳米粒子是一种新兴的纳米材料, 它可以被看成是直径在几纳米到几十纳米的纳米支架. 这种支架随修饰所用的功能基团的不同可带有不同的电性, 使得它能与表面带有相反电荷的蛋白质分子以静电相互作用结合. 因此, 近年来功能化金纳米粒子在生物学和药物学等研究领域得到人们越来越多的关注, 并在该领域显示出广阔的应用前景. 同时, 已有的研究结果还表明, 当所选用的修饰基团恰当时, 蛋白质分子在其表面吸附还可诱导一定的构象变化^[1].

蜂毒素 (Melittin) 分子的表面带有 6 个正电荷, 因此其与功能基团在溶液中通过静电吸附产生相互作用. 蜂毒素是蜜蜂蜂毒的主要成分之一, 占蜂毒干重的 50% (质量分数), 具有抗菌、消炎、抗辐射和抗关节炎等作用. 以往的研究结果表明, 蜂毒素在中性或酸性条件下主要以无规卷曲 (Random coil) 形式存在; 在碱性或高盐浓度溶液中可形成四聚的 α -螺旋结构 (α -helix)^[2]; 在磷脂双分子膜 (DOPC) 中的插入亦可诱导其由无规卷曲到单体 α -helix 的转变. 本文利用巯基丙酸、巯基己酸和巯基十一酸分别对金纳米粒子表面进行修饰, 得到了表面带有负电荷的功能化金纳米粒子, 并对功能化的金纳米粒子诱导 Melittin 形成 α -helix 的主要影响因素进行了研究.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Melittin 购于 Sigma 公司, 四氯金酸 ($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 购于上海试剂一厂, 巯基丙酸、巯基己酸和巯基十一酸均购于 Aldrich 公司; 硼氢化钠以及所用的有机溶剂均购于北京北化精细化学品有限公司 (分析纯). 实验用水为多次去离子蒸馏水.

日本岛津公司 Shimadzu RF-5301PC 型荧光光谱仪, 激发光源为 100 W 氙灯 (南京 South Brunswick 公司), 配备 A1010 单色仪. 日本岛津公司 Shimadzu UV-3100 光谱仪. 日本分光公司 JASCO 810 型圆二色谱仪. 英国马尔文公司 Zetasizer Nano ZS 型纳米粒度仪.

1.2 实验过程

金纳米粒子 (GNPs) 的制备参考文献 [3] 方法. 在新制备的金纳米粒子溶液中, 分别加入与四氯金酸等摩尔量的巯基丙酸 (MPA)、巯基己酸 (MHA) 和巯基十一酸 (MUA) 溶液, 于室温下继续搅拌 12 h. 得到酒红色的功能化纳米粒子溶液, 浓度约为 $4.91 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ ^[4].

收稿日期: 2008-04-03.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20773051) 和国家“九七三”计划 (批准号: 2007CB808006) 资助.

联系人简介: 吴玉清, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物体系分子间相互作用的谱学研究. E-mail: yqw@jlu.edu.cn

将蜂毒素配成浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 的水溶液作为储备液备用. 功能化的金纳米粒子与 Melittin 混合 0.5 h 之后再进行光谱或粒度检测.

2 结果与讨论

2.1 功能化修饰金纳米粒子与 Melittin 的作用

2.1.1 巯基丙酸修饰的金纳米粒子(MPA-GNPs)和巯基己酸修饰的金纳米粒子(MHA-GNPs)与 Melittin 的作用 以巯基丙酸和巯基己酸修饰的金纳米粒子作为研究对象, 利用 UV-Vis 吸收光谱监测不同浓度的 Melittin 对金纳米粒子的表面等离子共振吸收的影响(图 1).

在未加入 Melittin 时, MPA-GNPs 的吸收峰位出现在 520 nm 左右(图 1 谱线 *a*). 依据文献[5], 金纳米粒子通常在 $510 \sim 550 \text{ nm}$ 可见光范围内有一个吸收峰, 吸收波长随金颗粒直径的增大而增加, 且表观颜色依次由浅到深. $5 \mu\text{mol/L}$ Melittin 的存在可引起吸收峰发生 11 nm 的红移, 这可能是由于 Melittin 被吸附在 MPA-GNPs 表面所致; 较大的位移表明这种吸附可能导致了三维网状聚集结构的形成; 继续加入 Melittin, 当浓度达到 10 或 $13.3 \mu\text{mol/L}$ 时, 吸收峰相对于图 1 谱线 *b* 蓝移了 5 nm , 这可能是由于当每个 MPA-GNPs 的表面都覆盖上 Melittin 后, 多余的 Melittin 分子表面带有的正电荷使粒子之间产生排斥作用, 促使三维网状结构在一定程度上被解聚. 为了证实上述推论, 进一步开展了光散射粒度的测试, 结果如图 2 所示.

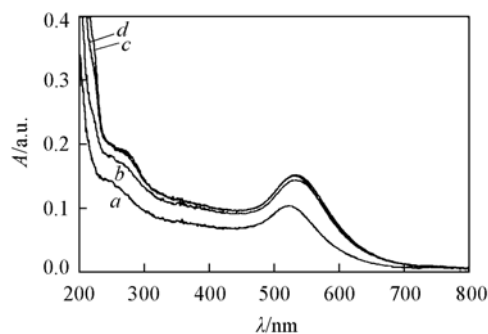


Fig. 1 UV-Vis spectra of MPA-GNPs ($4.26 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$) in the presence of different concentrations of Melittin at $\text{pH} = 7$

Concentration of Melittin/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: *a.* 0; *b.* 5; *c.* 10; *d.* 13.3.

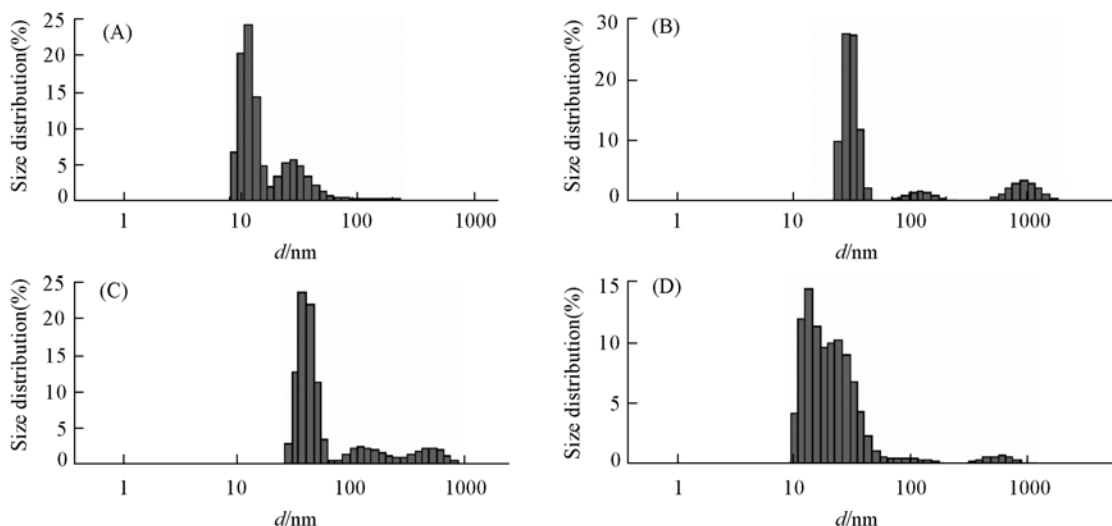


Fig. 2 Size distribution of MPA-GNPs with different concentration of Melittin at $\text{pH} = 7$

(A) Without Melittin, averaged diameter is 11.8 nm ; diameter between $8.72 \sim 15.7 \text{ nm}$ occupied 70.7% of total particles; (B) in the presence of $5.0 \mu\text{mol/L}$ Melittin, averaged diameter is 41.6 nm ; diameter between $32.7 \sim 50.7 \text{ nm}$ occupied 75.2% of total particles; (C) in the presence of $10.0 \mu\text{mol/L}$ Melittin, averaged diameter is 31.1 nm ; diameter between $24.4 \sim 37.8 \text{ nm}$ occupied 78.8% of total particles; (D) in the presence of $13.3 \mu\text{mol/L}$ Melittin, averaged diameter is 14.2 nm , diameter between $10.1 \sim 15.7 \text{ nm}$ occupied 46.6% of total particles; the second averaged diameter is 27.3 nm , diameter between $18.2 \sim 37.8 \text{ nm}$ occupied 48.9% of total particles.

从图 2 可以看出, 随着 Melittin 浓度的不断升高, MPA-GNPs 的粒径呈现出先增大再减小的趋势, 从另一方面也证明了 Melittin 的引入, 先是诱导纳米粒子聚集产生三维网状结构, 而后随着 Melittin 的增多, 正电荷间产生的静电排斥作用增强, 最终导致所形成的三维网状团聚被打开, 形成相对较小的粒子. 上述粒子的稳定性比较好, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下放置数天后即无沉淀生成也无颜色变化. MHA-GNPs 的表

面等离子共振吸收峰位与 MPA-GNPs 相近, 并且随着 Melittin 的加入也产生了和 MPA-GNPs 相似的先红移后蓝移的现象, 并在粒度的测试中有对应的体现. 这些结果都说明了 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Melittin 会引起巯基己酸修饰的金纳米粒子 MHA-GNPs 的团聚, 随着 Melittin 浓度的增大也会引起一定程度的解聚.

2.1.2 巯基十一酸修饰的金纳米粒子 (MUA-GNPs) 与 Melittin 的作用 巯基十一酸修饰的金纳米粒子 MUA-GNPs 在表面结构上具有更长的柔性修饰基团, 纳米粒子的表面等离子共振吸收峰 (图 3) 表明, 加入 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Melittin 只引起峰位 2 nm 的红移, 较小的位移表明纳米粒子间并没有形成团聚, 该位移可能主要是由于 Melittin 被吸附在 MUA-GNPs 表面所引起的. 10 或 $13.3 \mu\text{mol/L}$ Melittin 的存在引起进一步的微弱红移, 说明可能有更多的 Melittin 被吸附在 MUA-GNPs 表面. 对应体系的粒度测试结果进一步证实了上述结论.

2.2 功能化修饰金纳米粒子诱导蜂毒素构象变化

2.2.1 巯基丙酸修饰的金纳米粒子 (MPA-GNPs) 和巯基己酸修饰的金纳米粒子 (MHA-GNPs) 诱导蜂毒素构象变化 图 4(A) 是 Melittin 与 MPA-GNPs 相互作用的荧光发射光谱, 其中谱线 *a* 是 $10 \mu\text{mol/L}$ Melittin 在水溶液中的荧光发射光谱, 351 nm 处是它在无规卷曲状态下的特征荧光发射峰^[6]. 从图 4(A) 可以看出, MPA-GNPs 的加入引起 Melittin 的发射峰强度的下降 [图 4(A) 谱线 *b*], 这是由于金纳米粒子对 Melittin 的发色团产生猝灭所致, 这种猝灭的本质是由于金纳米粒子在 351 nm 处较强的吸收 (见图 1 和图 3) 构成非辐射能量转移. 但是, 峰位几乎没有移动, 说明 Melittin 在 MPA-GNPs 表面的吸附并不能诱导其构象的改变. 图 4(B) 为 Melittin 与 MHA-GNPs 相互作用的荧光发射光谱, 与 MPA-GNPs 相互作用的荧光发射谱基本一致.

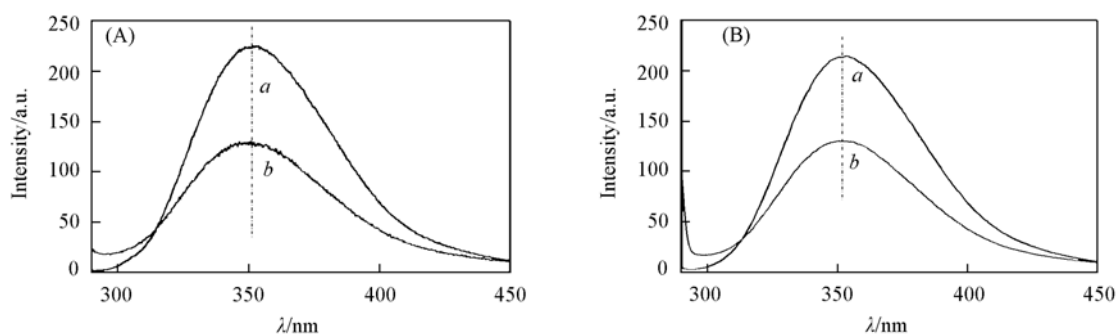


Fig. 4 Fluorescence spectra of Melittin in aqueous solution ($10 \mu\text{mol/L}$, $\text{pH} = 7$, $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$) before (*a*) and after (*b*) mixing with $4.26 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ MPA-GNPs (A) and $4.26 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ MHA-GNPs (B)

2.2.2 巯基十一酸修饰的金纳米粒子 (MUA-GNPs) 诱导蜂毒素构象变化 与 MPA-GNPs 和 MHA-GNPs 不同, 图 5 结果表明, Melittin 在 MUA-GNPs 表面上的吸附不但引起其荧光发射峰的强烈猝灭, 而且有明显的蓝移发生: 部分峰位由原来的 351 nm 蓝移至 334 nm . 这一结果与 2.5 mol/L NaCl ($\Delta\lambda_{\text{em}} = 13 \text{ nm}$) 和 DOPC ($\Delta\lambda_{\text{em}} = 20 \text{ nm}$) 诱导 Melittin 形成 α -helix 时发生的位移值接近^[7], 说明在 MUA-GNPs 表面上的吸附可能引起了 Melittin 由无规卷曲到 α -helix 的转变. 但是, 图 5 谱线 *b* 在 350 nm 附近仍有一个肩峰存在, 说明 Melittin 的这种构象转变并不完全.

为了定量检测 MUA-GNPs 诱导蜂毒素由无规卷曲到 α -helix 的转变量, 分别测试了 MUA-GNPs、 $10 \mu\text{mol/L}$ 蜂毒素单独存在以及分别加入 MPA-GNPs 和 MUA-GNPs 后的圆二色谱 (图 6). 图 6 谱线 *b* 中 208 和 222 nm 处的 Cotton 效应峰对应于 Melittin 的 α -helix 结构. 随着 MPA-GNPs 的加入, 这两个波长的 Cotton 效应峰无明显变化, 表明 α -helix 的含量基本不变, 证明 MPA-GNPs 不能诱导更多 α -helix 结

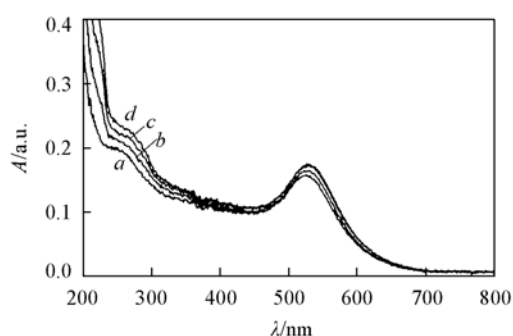


Fig. 3 UV-Vis spectra of MUA-GNPs ($4.26 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$) in the presence of different concentration Melittin at $\text{pH} = 7$

Concentration of Melittin/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$:
a. 0; b. 5; c. 10; d. 13.3.

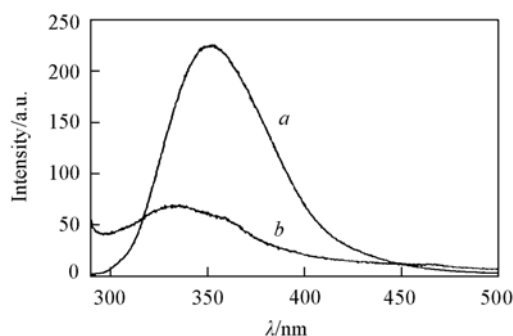


Fig. 5 Fluorescence spectra of Melittin in aqueous solution ($10 \mu\text{mol/L}$, $\text{pH} = 7$) before (*a*) and after (*b*) mixing with MUA-GNPs ($4.26 \times 10^{-9} \text{mol/L}$)
 $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{nm}$.

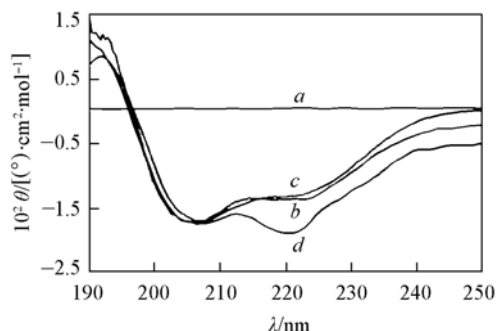


Fig. 6 CD spectra of MUA-GNPs ($4.26 \times 10^{-9} \text{mol/L}$) (*a*), $10 \mu\text{mol/L}$ Melittin alone (*b*) and those in the presence of MPA-GNPs ($4.26 \times 10^{-9} \text{mol/L}$) (*c*) and MUA-GNPs ($4.26 \times 10^{-9} \text{mol/L}$) (*d*) at $\text{pH} = 7$

构的形成. 当加入 MUA-GNPs 后, 222 nm 处的负 Cotton 效应峰明显增强, 表明 α -helix 的含量增加. 证明了 MUA-GNPs 的加入确实诱导 Melittin 由无规卷曲到 α -helix 的转变. 通过 α -helix 含量的定量计算^[8], 证实吸附前后 α -helix 质量分数从 16.6% 提高到了 23.1%.

为了研究 Melittin 与 MUA-GNPs 的相互作用与酸度的关系, 测试了 Melittin 与 MUA-GNPs 混合体系在 $\text{pH} = 4 \sim 12$ 范围内多个不同酸度条件下的荧光光谱图, 由于有一些谱线相互重合, 图 7 只给出 $\text{pH} = 5, 7$ 和 9 的荧光光谱. 由图 7(A) 可以看出, 随着 pH 值的提高, Melittin 的蓝移逐渐增大, 最终可达到 333 nm. 对照组[图 7(B)]结果表明, 未引入 MUA-GNPs 时, Melittin 随着 pH 值的变化只发生了微弱的蓝移 ($\Delta\lambda < 5 \text{nm}$). 由此可见, MUA-GNPs 的引入, 诱导 Melittin 形成了 α -helix, 而且能达到文献[7,9]水平的位移. 这种构象变化很稳定, 7 d 内不随时间的变化而改变.

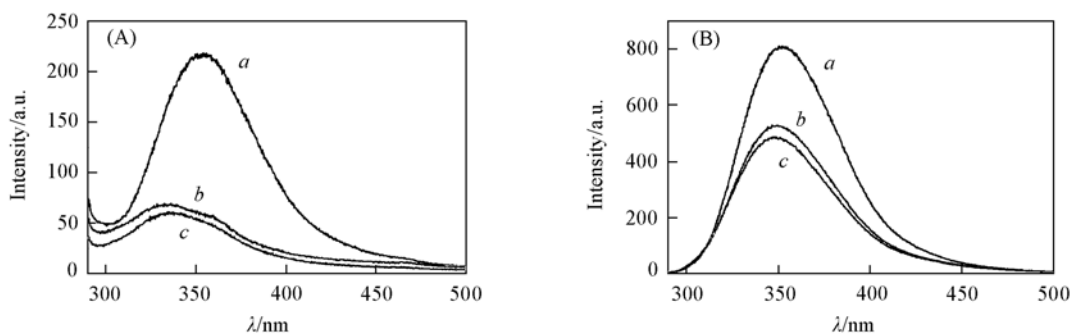


Fig. 7 Fluorescence spectra of $10 \mu\text{mol/L}$ Melittin with (A) and without (B) MUA-GNPs ($4.26 \times 10^{-9} \text{mol/L}$) at different pH values
a. $\text{pH} = 5$; *b.* $\text{pH} = 7$; *c.* $\text{pH} = 9$.

综上所述, 由于静电相互作用, Melittin 在功能化纳米粒子 MPA-GNPs, MHA-GNPs 和 MUA-GNPs 的表面都能被吸附, 且其浓度直接影响纳米粒子的团聚状态. 但由于功能化修饰分子的结构差异导致 MUA-GNPs 能诱导其表面的 Melittin 由无规卷曲到 α -helix 的转变, 而 MPA-GNPs 和 MHA-GNPs 却不能, 说明了链长对金纳米粒子有一定的影响. 另外, 研究结果还表明, MUA-GNPs 诱导形成 α -helix 的比例并不高, 因此改进性研究方案正在进行中.

参 考 文 献

- [1] Verma A., Nakade H., Simard J. M., *et al.*. J. Am. Chem. Soc. [J], 2004, **126**: 10806—10807
- [2] Khajehpour M., Troxler T., Nanda V., *et al.*. Protein [J], 2004, **55**: 275—287
- [3] Kim Y. J., Johnson R. C., Hupp J. T.. Nano Lett. [J], 2001, **1**(4): 165—167
- [4] Huang C. C., Chang H. T.. Chem. Commun. [J], 2007, **12**: 1215—1217
- [5] WANG Nan(王楠), XU Shu-Kun(徐淑坤), WANG Wen-Xing(王文星). Progress in Chemistry(化学进展) [J], 2007, **19**(2/3):

408—413

- [6] QIU Wei-hong, ZHANG Lu-yuan, KAO Ya-ting, *et al.*. J. Phys. Chem. B[J], 2005, **109**(35): 16901—16910
- [7] WANG Lei(王磊), HAO Ya-Qiong(郝雅琼), LI Yue(李岳), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(6): 1112—1115
- [8] SHEN Xing-Can(沈星灿), LIANG Hong(梁宏), HE Xi-Wen(何锡文), *et al.*. Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)[J], 2004, **32**(3): 388—394
- [9] LI Shun-Zi(李顺子), SUN Xue-Jun(孙学军), YAN Hu-Sheng(阎虎生), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(1): 73—77

Adsorption and Conformational Changes of Melittin on the Surface of Functionalized Gold Nanoparticles

WANG Lei, DANG Yong-Qiang, ZHANG Min, SUN Jian, WU Yu-Qing*

(State Key Laboratory for Supramolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract As the wide applications of gold nanoparticles(GNPs) in various fields as the biochemistry and biomedicine, the present investigation is geared to the practical demand. Recently, the capability of sulphhydryl carboxylate functionalized GNPs to promote the folding of a positive charged peptide into an α -helix was established. This design allowed favorable electrostatic interactions between the nanoparticles and the peptide when the positive charged residues were positioned in a cofacial manner along the helix and was responsible for the assisted folding observed. GNPs coated with different chain lengths of sulphhydryl carboxylate are prepared by adding sulphhydryl carboxylate into GNPs solution which is synthesized *via* reducing tetrachloroauric acid (HAuCl_4) by sodium borohydride. The structure of the functionalized GNPs can make it interact with electriferous proteins. Multiple spectral means have been used to study the interaction between the functionalized GNPs and melittin. The results show that the functionalized GNPs induced melittin to form α -helix by electrostatic interactions, and it is directly related with the chain length of sulphhydryl carboxylate.

Keywords Functionalized gold nanoparticles; Melittin; α -Helix

(Ed. : S, I)