



含催化单元的单层保护纳米Au水解酶的研究进展

李芳, 李帅冰, 姚美霞, 沈江珊*

华侨大学材料科学与工程学院, 厦门 361021

*通讯作者, E-mail: jsshenn@hqu.edu.cn

收稿日期: 2021-04-18; 接受日期: 2021-06-04; 网络版发表日期: 2021-10-18

福建省引导性项目(编号: 2020Y0038)和厦门市科技局项目(编号: 3502Z20193029)资助

摘要 纳米酶能够在生理条件下催化天然酶所介导的生化反应, 表现出天然酶所具有的反应动力学过程和催化机制. 在单层保护纳米Au (Au MPCs)表面自组装催化单元可大大提高纳米酶的催化能力, 近年来发展迅速. 本文总结了近年来含催化单元的Au MPCs水解酶的研究进展, 重点讨论了Au MPCs水解酶表层催化单元的设计、超分子组装及其应用.

关键词 Au MPCs, 催化反应, 人工水解酶

1 引言

众所周知, 酶在生命体系中扮演非常重要的角色, 可触发成千上万生化反应的发生, 维系生命运转. 然而, 天然酶也存在着诸多自身不足, 如其活性容易被高酸度、高碱度和高温等外界条件破坏, 导致其实验环境的要求比较苛刻. 正是天然酶的这些局限性, 促使化学家尝试通过化学合成的方法来发展人工模拟酶. 自2004年Scrimin研究团队^[1]首次提出了“纳米酶(nanozymes)”的概念以来, 有关纳米酶的研究被大量报道^[2~5]. 纳米酶被定义为拥有酶特性的纳米材料^[4], 在生理条件下其能够催化天然酶所介导的生化反应, 表现出酶所具有的反应动力学过程和催化机制^[6,7].

水解酶是一大类能催化生物水解反应的同工酶, 包括碳酸酐酶、羧酸酯酶、脂肪水解酶、蛋白水解酶和磷酸酯酶. 近年来, 纳米水解酶的研究蓬勃发展, 大量具有水解酶活性的纳米材料被报道^[8~10]. 其中, 最为

引人注目的是表面修饰有催化单元的纳米Au水解酶.

巯基分子通过强大的Au-S键^[11,12], 在纳米Au表面自组装含催化单元的单分子层, 不仅使纳米Au具有优秀稳定性、分散性、可溶性和生物相容性, 而且赋予纳米Au诸多独特的性质. 例如, 其催化活性展示出高协同性^[13,14], 所以该方法正逐渐成为一种有吸引力的策略. 纳米Au在人工水解酶中起两方面的作用: (1) 催化单元组装到纳米Au表面后, 可降低催化单元的流动性, 使之位置相对固定, 有利于相邻催化单元间形成一个催化“口袋”, 导致其催化效率提高; (2) 纳米Au作为催化单元的载体, 催化单元与纳米Au表面通常通过疏水烷基链链接, 为纳米Au表面提供了疏水性微环境, 有利于催化反应中间态的稳定. 正是如此, 这些表面修饰的纳米Au在化学传感、生物医学和临床诊断等研究领域崭露头角^[15,16].

本文综述了近年来含催化单元的单层保护纳米Au (monolayers protected gold clusters, Au MPCs)水解

引用格式: Li F, Li S, Yao M, Shen J. Development of monolayer-protected gold clusters-based hydrolytic nanozymes containing catalytic units. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 1579–1589, doi: 10.1360/SSC-2021-0097

酶的研究进展.

2 单层保护纳米Au水解酶催化单元设计

2.1 含金属离子配位物

许多金属离子配合物作为催化磷酸酯和羧酸酯水解的模拟酶具有良好的催化效果. 大环多胺因其有多个N原子和大环空间效应使之具有优良配位环境, 常用于构筑水解模拟酶的活性中心^[17,18], 其中1,4,7-三氮杂环壬烷(TACN)的研究最为深入^[19]. TACN可以和多种金属离子络合, 如 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{3+} 、 Ce^{4+} 、 Fe^{3+} 、 Cd^{2+} 等, 其金属离子配合物可显示模拟酶的催化活性. 其中, Zn^{2+} 配位物最常见^[20,21]. 许多天然水解酶使用 Zn^{2+} 作为辅助因子, 如碳酸酐酶和金属蛋白酶. TACN- Zn^{2+} 配合物主要通过路易斯酸的作用来加速磷酸二酯的酯键水解^[22,23]. 需要指出的是, 核酸分子是通过磷酸二酯键将各个碱基逐个联接形成的, 而磷酸二酯键键能非常大, 使其很稳定, 难以被水解. 现有研究表明, 核酸分子的半衰期均在100亿年以上. 因此, 研究磷酸酯人工水解酶意义重大.

2004年, Scrimin研究团队^[1]在纳米Au表面上修饰了末端含有TACN配体的辛烷基硫醇($\text{HS-C}_8\text{-TANC}$), 通过在溶液中添加 Zn^{2+} , 使其末端生成TACN- Zn^{2+} 配合物从而获得Au MPCs 1 (图1). 研究发现, Au MPCs 1能催化作为RNA模型底物的2-羟丙基-4-硝基苯基磷酸酯(HPNP)水解. 与表面未修饰催化基头的纳米Au和未组装在纳米Au表面上的TACN- Zn^{2+} 相比, Au MPCs 1催化HPNP水解的二级反应速率常数分别提高了4个数量级和2个数量级. 进一步的研究表明, 当TACN- Zn^{2+} 修饰到纳米Au表面上后, 催化单元的流动性降低, 位置相对固定, 使之熵值下降, 相邻两金属配位物会形成一个催化“口袋”, 类似双核配合物, 促使两个 Zn^{2+} 离子协同作用于底物HPNP (图1). 并且多价性(multivalency)的纳米Au表面, 导致其可形成多个“催化口袋”, 使之具有显著的催化协同性, 从而获得高催化活性, 使磷酸酯键被剪切^[24]. 此外, 催化单元与纳米Au表面通常通过疏水烷基链联接, 为纳米Au表面提供了疏水性微环境, 有利于催化反应中间态的稳定, 提高其催化活性^[25].

人工酶中配体的刚性、双金属核的间距、金属离子与配体原子结合方式及空间构型等因素均会影响金

属配合物对底物的选择性识别与结合^[26].

Scrimin课题组^[27]研究了配体结构的变化对催化水解反应的影响. 他们比较了含TACN的Au MPCs 1与含TACN甲基衍生物1,4,7-三甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷(TTCN) (图2)的Au MPCs 2催化HPNP水解反应的活性. 实验发现, 配体结构的微小变化对Au MPCs催化能力有着巨大的影响. Au MPCs 1和Au MPCs 2催化HPNP水解反应的二级反应速率常数随溶液pH变化而有很大的差异. Au MPCs 2的二级反应速率常数随溶液pH变化的曲线并不符合五配位金属离子配合物的典型“bell”状曲线, 这是由于产生不同去质子态的反应物种所造成的.

Czescik等^[28]制备了一系列末端带有TACN基团的硫醇分子, 并将之修饰在纳米Au表面后再与 Zn^{2+} 配位, 可获得Au MPCs 3~7 (图3). 硫醇3和4是末端带有TACN的链状分子. 与4相比, 3直链上增加了一个酰胺

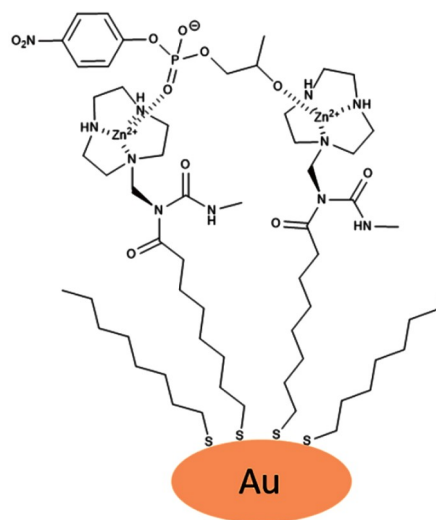


图1 Au MPCs 1的结构及作用机理^[25] (网络版彩图)

Figure 1 The structure and mechanism of Au MPCs 1 ^[25] (color online).

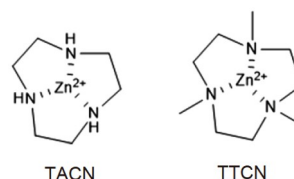


图2 TACN与TTCN的结构^[27]

Figure 2 The structures of TACN and TTCN ^[27].

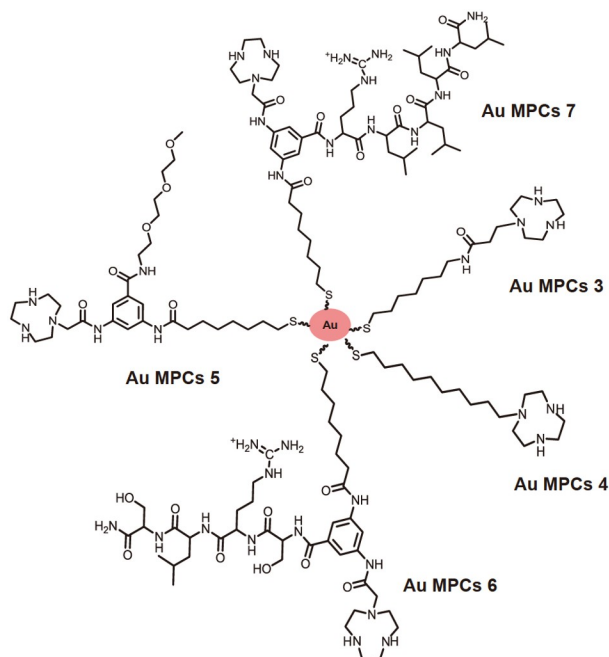


图 3 Au MPCs 3~7 的结构示意图^[28] (网络版彩图)
Figure 3 The structures of Au MPCs 3~7^[28] (color online).

基团, 酰胺的存在使得单层内的硫醇链之间可以形成氢键, 导致其排列更紧密, 而4的疏水性更强. 5~7也含有TACN基团, 但另外具有Y形结构. 利用Y形结构可避免硫醇在单分子层上聚集而失去协同作用. 其中, 5为一条短的聚醚链, 6为四肽H-Ser-Arg-Leu-Ser-NH₂, 7为五肽H-Arg-Leu-Leu-Leu-Leu-NH₂. 含4个Leu的五肽7使其催化位点亲水性较弱. 他们研究了这些巯基分子表面修饰的纳米Au催化HPNP水解反应的活性, 发现表面具有结构更紧凑单分子层的Au MPCs 3的催化效率(二级反应速率常数 k_2 达到331 M⁻¹ s⁻¹)优于其他几种模式, 其 k_2 是Au MPCs 4的4倍. 这是目前对HPNP底物催化效率最高的催化剂之一. 需要指出的是, 相对于其他催化参数如 k_{cat} 或 k_m , 二级反应速率常数 k_2 更能够反映不同催化剂体系的催化活性大小. 实验结果再次证实了由两个金属离子在催化位点形成催化“口袋”起到关键作用, 并且基于双核催化位点的机理比基于金属配合物和胍盐之间的协同作用机理更有效. 他们指出, 可以用一个胍基阳离子代替一个金属离子, 但会导致纳米酶的催化效率略有下降, 并且减少金属中心的自由度有助于增加协同作用.

他们还比较了Au MPCs 3~7催化DNA模拟底物

BNP和PBR322 (环状双链DNA, 长度为4361个碱基对)的情况^[29]. 实验证实, Au MPCs催化BNP水解也需要联合两个Zn²⁺离子进行. 表面修饰不同巯基分子的纳米Au在Zn²⁺存在下均有一定的催化活性, 大小顺序为Au MPCs 3 > Au MPCs 5 > Au MPCs 4. 而Au MPCs 6和Au MPCs 7在亲脂性很强的底物BNP存在下不太能够溶于水溶液, 可以通过在水溶液中加入5%二甲亚砜(DMSO), 解决Au MPCs 6的溶解问题, 但Au MPCs 7仍然未能溶解. Au MPCs 6可以有效地催化pBR322质粒DNA的切割, 可能的作用机制为其磷酸二酯参与金属离子配位, 而带正电荷的精氨酸侧基协助过渡态稳定, 并降低丝氨酸羟基的 pK_a .

长烷基链可以提供较低极性的微环境和较柔软的构象, 故Diez-Castellnou等^[30]通过合成末端为TACN且具有不同烷基链长的巯基分子, 制备出表面修饰有TACN-Zn²⁺催化基头单分子层的Au MPCs 8~11 (图4), 并比较了它们催化HPNP水解的能力. 研究发现, 水解反应活性随Au MPCs表面单分子层极性的降低而增加, 含有较长烷基链的Au MPCs 9、11的反应性显著高于Au MPCs 8. 而Au MPCs 9和Au MPCs 10的表面烷基链长是相同的, 区别在于Au MPCs 10表面巯基分子中间存在两个醚氧而不是亚甲基, 这使得Au MPCs 9表面单分子层比Au MPCs 10具有更高的构象柔软性和更低的极性. 尽管这对Au MPCs表面TACN-Zn²⁺基头与底物分子的结合能力没有太大的影响, 但是极性低的单分子层表面更有利于稳定HPNP水解反应过程中形成的过渡态, 使得Au MPCs 9的催化活性($k_2 = 437$ M⁻¹ s⁻¹)比Au MPCs 10的($k_2 = 50$ M⁻¹ s⁻¹)高10倍.

Chen等^[31]通过在纳米Au表面自组装含有TACN-Zn²⁺基头的手性硫醇分子, 获得了手性催化剂(+)-1和(-)-1, 其手性源自于L-或D-Ser. (+)-1或(-)-1对CF₃HPNP底物分子对映体的水解反应均表现出对映体选择性. 重要的是, 这类手性催化剂能够对映体选择性地催化天然化合物二核苷酸如UpU、GpG、ApA、CpC的水解反应. 其中, 最显著的对映体选择性出现在UpU的水解反应上. 他们认为手性硫醇分子在纳米Au表面上自组装形成单分子层使之具备了高的协同效应, 对实现对映体选择性催化水性磷酸二酯底物分子水解起到重要作用.

除了TACN配位基头, 其他基团也被用于构建纳米Au水解酶. 例如, Bonomi等^[32]合成了含双(2-氨基-

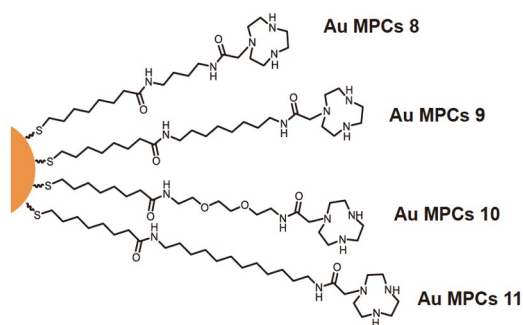


图4 Au MPCs 8~11的结构示意图^[30] (网络版彩图)

Figure 4 The structures of Au MPCs 8–11 [30] (color online).

吡啶基-6-甲基)胺(bis-(2-amino-pyridyl-6-methyl) amine, BAPA, 图5)基团的硫醇分子, 将其组装于Au MPCs表面. 同时, 还在Au MPCs表面组装层中引入一定比例的具有三(乙二醇)单元的硫醇分子以改善纳米Au的水溶性, 可获得稳定的Au MPCs@BAPA-Zn²⁺. 他们研究了Au MPCs@BAPA-Zn²⁺催化DNA模拟底物BNP的水解反应, 发现由于BAPA-Zn²⁺配合物能有效地诱导金属路易斯酸和氢键之间的协同作用^[33,34], 使该纳米Au的二级反应速率常数有很大提高. 通过研究反应速率常数与添加Zn²⁺离子的量关系, 发现在低浓度的Zn²⁺离子存在下, 生成的是单核金属配合物, 其催化二级反应速率常数比游离单体配合物大近10倍; 而在当Zn²⁺离子浓度达到饱和时, 形成的是双核金属配合物, 其催化速率常数比单核配合物高一个数量级, 比游离单体配合物高2个数量级, 比OH⁻催化底物反应高出近60000倍. 研究表明, 双核金属配合物的催化活性比单核金属配合物更高, 源于双核金属配合物中形成类似的催化“口袋”可更有效地与底物分子作用.

除了Zn²⁺离子之外, 这种催化体系还可以扩展到其他金属离子, 如Ce(IV)^[35]、Cu²⁺和Cd²⁺^[21]. Bonomi等^[35]将带有四齿形聚羧酸盐配体(MPGNs, 图6)组装在纳米Au表面上, 并与Ce(IV)配位, 得到Au MPCs@MPGNs-Ce(IV). 他们研究了Au MPCs@MPGNs-Ce(IV)催化BNP水解反应的能力, 发现Ce(IV)浓度低至120 μM时其催化BNP水解的反应速率提高了250万倍. 这个材料的催化反应活性比目前报道的任何单核或双核Ce(IV)络合物的催化反应活性高了1~2个数量级, 这种催化反应活性源自于纳米Au表面自组装的金属离子之间的相互作用.

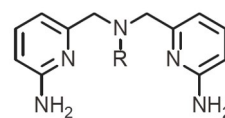


图5 BAPA结构示意图(R=H)^[32]

Figure 5 The structure of BAPA (R=H) [32].

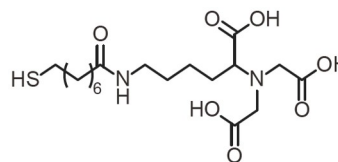


图6 MPGNs结构示意图^[35]

Figure 6 The structure of MPGNs [35].

2.2 多肽

肽在纳米Au表面上的自组装已成为发展人工酶的一种有效策略^[36]. 与未结合的多肽相比, 在纳米Au表面有局部密度较高的多肽, 可产生协同效应, 导致高催化活性.

2005年, Pengo等^[37]率先报道了表面修饰有催化活性的二肽Au MPCs. 他们合成了含有巯基的长烷烃链二肽HS-(CH₂)₁₁CO-HisPhe-OH, 并将其组装于纳米Au表面上, 得到末端同时含羧酸和咪唑基团的自组装单层. 同时在纳米Au表面混合组装一定比例的具有水溶性的硫醇分子, 使纳米Au的水溶性获得改善. 他们研究了该二肽表面修饰的纳米Au在催化2,4-二硝基苯基丁酸酯(DNPB)和Z-亮氨酸-对硝基苯酯(Z-Leu-PNP)水解反应中的活性, 发现在pH<7时, 自组装层中的羧酸根阴离子充当活化水分子的碱, 而质子化的咪唑充当酸的角色, 二者协同作用于底物分子, 使水解反应速度提高了近300倍; 而二肽CH₃CO-His-Phe-OH单体则缺乏这种协同作用, 仅咪唑基团参与水解反应, 活性很低. 纳米Au表面修饰的高密度二肽使之产生了新的微环境, 当二肽游离在溶液中时, 新的微环境导致新的氢键网络和残基之间存在协同作用, 这种作用能够产生类似于天然酶活性位点的复杂环境. 因此, 采用表面修饰二肽的纳米Au可以产生比单体二肽高几个数量级的催化活性. 随后, 他们将十二肽Leu-Gly-Tyr-Lys-Ala-His-Phe-Ala-Gly-Arg-Gly-Arg-OH接枝到纳米Au表面上, 研究其催化底物分子DNPB的水解反应^[38]. 该多肽含有1个His、2个Arg和1个Lys残基, 不仅可以

实现亲核反应、一般酸和/或一般碱的催化反应, 而且可以稳定羧酸酯水解过程中产生带负电荷的过渡态. 具有催化活性的His被设计处于居中位置, 固定到纳米Au表面上后, His因被埋在单层内部导致其溶解度较低, 类似于天然酶的活性位点. 其研究结果进一步支持了纳米Au表面上的微环境不同于体相溶液, 可发生协同作用. 在较高pH下, 表面修饰十二肽的纳米Au因为Lys的-OH也起到亲核作用, 使其催化活性比先前的表面修饰二肽纳米Au的显著增加.

Prins课题组^[39]制备了末端含有三甲基铵基疏基的分子, 并通过Au-S键作用将之修饰到Au MPCs表面上, 然后通过静电吸引作用自组装含有催化活性His基团的寡肽分子得到Au MPCs 12 (图7), 研究其催化底物Cbz-Phe-ONP水解反应. 他们发现Au MPCs 12导致底物水解反应速度增加了至少2个数量级. 研究表明, 纳米Au表面自组装是催化反应活性产生的先决条件, 因为缺乏Au MPCs, 寡肽本身不具有催化活性. Au MPCs的多价性表面给寡肽自组装提供了便利, 使得邻近的催化基头和底物分子之间协调作用, 并改变了局部的微环境, 导致自组装膜中具有较高的局部pH值, 使得去质子化咪唑基团的浓度增加, 从而提高催化活性.

Kokschi课题组^[40]将含有Cys和His的十一肽NH₂-Cys-Gly-Gly-Tyr-Glu-Ile-Thr-His-Leu-Glu-Lys-OH通过Cys的巯基自组装到纳米Au表面上, 由此制备出了仅有多肽单组装层的纳米Au水解酶Au MPCs 13 (图8). 研究表明, Au MPCs 13可以在相同的反应条件下依次催化一系列不同羧酸酯底物分子的水解反应. Au MPCs 13不仅可以当酶模拟物催化羧酸酯水解, 而且也可在过量的NaBH₄存在下, 作为高效的氢化催化剂, 用于芳香胺底物分子催化加氢还原反应.

他们还发现了多肽的结构对多肽-Au MPCs的催化活性具有重要影响^[41], 可以通过将多肽构象从无规卷曲变为固定在纳米Au表面上的卷曲螺旋结构来调节多肽-Au MPCs的催化反应活性, 这为设计具有更复杂的结构-功能关系的酶模拟物提供了可行的方法. 将含有His和Glu的多肽E3H15通过N端Cys的巯基连接到纳米Au表面上, 得到Au MPCs 14. 实验发现, Au MPCs 14对pNPA水解反应的催化活性与未固定的E3H15相比, 提高了1个数量级. 当加入等摩尔的K3后, 因为E3H15和K3 (图9)两种多肽均包含 α -螺旋折叠型体, 故

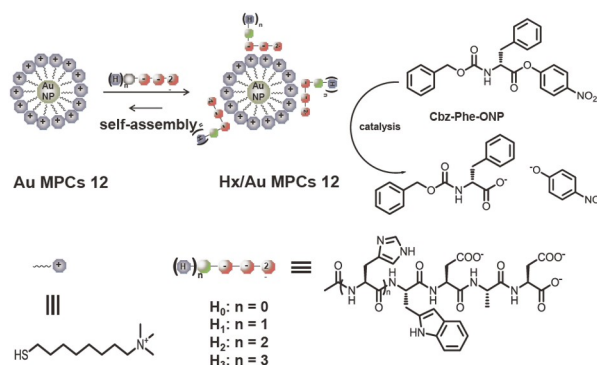


图7 肽H₀~H₃在Au MPCs 12表面的自组装, 生成H_x/Au MPCs 12复合物(对于x=1~3)可催化底物Cbz-Phe-ONP酯水解反应示意图^[39] (网络版彩图)

Figure 7 Self-assembly of peptides H₀~H₃ on the surface of Au MPCs 12, resulting in the formation of H_x/Au MPCs 12 complexes that (for x=1~3) can catalyze the transesterification of the substrate Cbz-Phe-ONP ^[39] (color online).

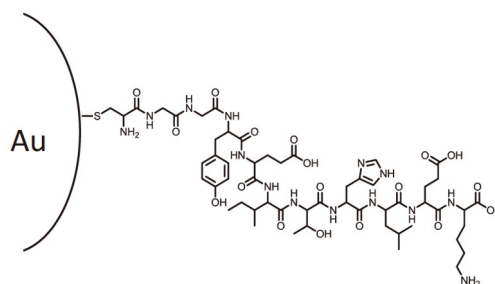


图8 Au MPCs 13的结构^[40]

Figure 8 The structure of Au MPCs 13 ^[40].

容易诱导卷曲螺旋的形成. 多肽构象从无规卷曲变为固定在纳米Au表面上的卷曲螺旋结构, 固定卷曲螺旋结构的产生以及E3H15和K3混合层的形成, 导致Au MPCs 14催化活性受到显著抑制.

Mikolajczak等^[42]发现多肽设计的微小变化可以导致截然不同的催化活性. 羧酸酯水解的反应速率与底物分子的疏水性以及催化单元的位置相关, 故多肽-Au MPCs的催化活性和底物特异性可通过活性中心在肽序列中的位置及其在自组装肽单层中的位置来调节. 他们制备了Au MPCs 15~17, 三者的结构仅催化单元His在肽链所处的位置不同. His的位置在Au MPCs 15中靠近Au核, 在Au MPCs 16中处于中央位置, 在Au MPCs 17中则靠近外表层(图10). 实验发现, 疏水性高的羧酸酯底物易被Au MPCs 15有效水解, 而Au MPCs 16则对疏水性较低的酯底物有更高的水解速率.

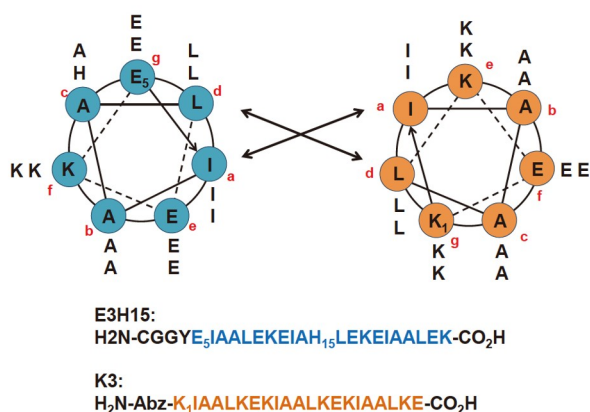


图9 E3H15和K3的肽序列。七肽重复模式以蓝色(E3H15)和橙色(K3)显示,并在斜轮图中显示^[41](网络版彩图)

Figure 9 Peptide sequences of E3H15 and K3. Heptad repeat patterns are highlighted in blue (E3H15) and orange (K3) and represented in the helical wheel diagram ^[41] (color online).

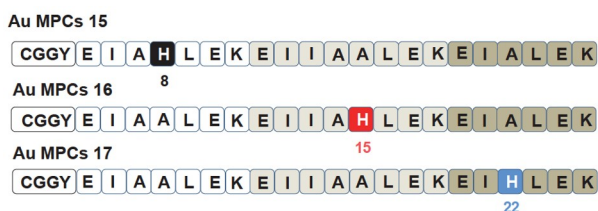


图10 Au MPCs 15~17中的肽序列^[42](网络版彩图)

Figure 10 Peptide sequences of Au MPCs 15~17 ^[42] (color online).

Koksch课题组^[43]最近证实了在多肽-Au MPCs中加入 Zn^{2+} 可以大大提高其催化羧酸酯水解的反应速率和 CO_2 的水合速率。他们将 β 折叠的七肽IHQ-NP组装到纳米Au表面上得到Au MPCs 18,其中三个His配体形成一个链间3-His- Zn^{2+} 结合位点,其功能类似于碳酸酐酶的活性中心(图11)。尽管在没有 Zn^{2+} 的情况下IHQ-NP和Au MPCs 18都可以催化乙酸4-硝基苯酯(4-NPA)水解并略微催化 CO_2 水合,但是在 Zn^{2+} 存在的情况下,两种催化剂的催化效率都能显著提高。与 Zn^{2+} -IHQ-NP相比, Zn^{2+} -Au MPCs 18对羧酸酯水解反应和 CO_2 的转化率提高更为显著。

3 单层保护纳米Au水解酶表面超分子组装

表面修饰有阳离子头基团的Au MPCs与带负电荷的生物大分子(如蛋白质和DNA等)之间存在静电相互

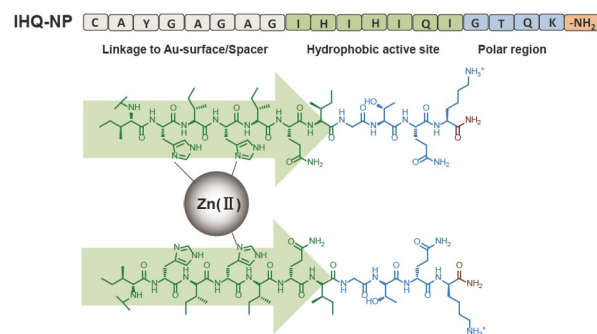


图11 Au MPCs 18中IHQ-NP的肽序列, IHQ-NP的极性区域(蓝色)和疏水链段(绿色)的结构,以及相应的3-His- Zn^{2+} 结合位点(绿色箭头)^[43](网络版彩图)

Figure 11 The peptide sequence of IHQ-NP in Au MPCs 18, the structure of polar region (blue) and hydrophobic segment (green) of IHQ-NP, and the corresponding 3-His- Zn^{2+} binding site (green arrow) ^[43] (color online).

吸引作用^[15],使得Au MPCs成为可实现多种功能的平台^[44]。通过Au-S键强配位作用将含有不同功能基团的硫醇分子修饰到纳米Au表面上,再利用超分子组装作用对纳米Au的单层表面进行改性,为纳米Au水解酶设计催化位点提供了新途径。

Prins课题组^[39]将带负电荷的肽分子自组装到具有阳离子头基团的Au MPCs表面上,发展出获得纳米Au水解酶的新方法。他们分别制备了含有三甲基铵头的Au MPCs,以及包含带负电荷的Asp残基和用于催化羧酸酯水解的His残基组成的寡肽分子,利用静电吸引作用促使寡肽分子与带正电荷的Au MPCs表面结合。寡肽分子的存在使得Au MPCs 12催化底物Cbz-Phe-ONP的水解速率至少增加了两个数量级。该方式可在不需要合成含有催化头基的巯基分子的情况下创建复杂的催化体系,只需将带负电荷的小分子添加到带正电荷的Au MPCs中即可实现其在Au MPCs表面的自组装,从而获得多价超分子催化剂体系。

随后,Prins课题组^[45]制备了含HS-C9-TACN- Zn^{2+} 的Au MPCs 19(图12),其正电荷源自于与TACN配体络合的 Zn^{2+} 金属离子,这使其具有较高的结合亲和力和表面饱和浓度^[46],为带负电荷的分子在Au MPCs 19表面上的自组装提供了方便。他们发现,一些寡聚阴离子,如富含Asp/Glu的寡肽和核苷酸,对Au MPCs 19表面有很高的亲和力。寡聚阴离子浓度即使低至1 mM以下,Au MPCs 19的阳离子表面仍可以定量结合多达18个寡聚阴离子。通过改变所添加寡聚阴离子

的比例, 可以控制纳米Au的表面组成. 进一步的研究表明, 这种亲和力取决于纳米Au表面所带寡聚阴离子负电荷的数量^[47], 寡聚阴离子的种类也对这种自组装有明显的影响, 如Au MPCs 19对磷酸盐的亲和力要比对羧酸盐的更高. 此外, 这些小分子和纳米Au单层膜非极性部分之间的疏水作用也对结合有很大的贡献^[39,48]. 小分子的疏水基团(如芳烃单元)可以插入纳米Au表面单层的疏水部分, 疏水作用的存在允许小分子即便负电荷的数量减少也可与Au MPCs 19紧密地结合.

Pieters等^[49]发现Au MPCs 19单分子层上的金属离子可作为调控元素, 结合到Au MPCs 19表面的分子数可以通过单分子层上金属离子的数量来控制; 通过改变金属离子在单分子膜中的比例, 还可以调节释放速率. pH的变化也可以控制离子价态的变化和释放速率, 且这个过程是完全可逆的; 在单一pH下, 通过改变不同金属离子的比例也可以调节释放速率.

Martin等^[50]发现纳米Au的表面单层可以简单地通过改变添加肽的序列或比例来调节. 他们合成了7种不同序列的五肽分子, 其总序列为Ac-XXGWS(OPO₃²⁻)-OH. 研究发现, 除了含正电荷的肽外, 其余5种肽分子对Au MPCs 19表面都具有高亲和力. 当加入过量的ATP时, 因ATP与Au MPCs 19的亲合性更强, 它将从纳米Au表面上置换掉所有肽分子. 纳米Au表面的组成可通过改变外加溶液而调整. 这种动态表面可以适应环境的变化, 并可用于痕量物质的检测.

Della Sala等^[51]发现纳米Au和核苷酸之间相互作用的选择性, 可以通过存在于单层膜中大环-Zn²⁺配合物的性质来控制. 他们合成了表面含有1,4,7,10-四氮杂环十二烷(CYCLEN-Zn²⁺)头基的纳米酶Au MPCs

20 (图12), 并研究了4种不同浓度的12种核苷酸XNP (X=A、G、T、C; N=M、D、T)对Au MPCs 19和Au MPCs 20的结合作用. 这种亲和作用基于探针B (香豆素343-Gly-Asp-Asp)与上述两种纳米酶表面之间的结合所导致的荧光强度变化来探测. 实验结果显示, Au MPCs 19对GMP有较高的亲和力, 而Au MPCs 20则优先与TMP结合, 而且即使在低微摩尔浓度的生理条件下, 这种选择性结合仍能发生.

4 应用

4.1 催化信号放大传感

从理论上分析, 如果催化反应满足如下四个条件, 则可实现信号放大: (1) 目标物与预催化剂之间有足够的结合常数以及过量的预催化剂(保障1个目标物分子能够产生1个被激活的催化剂分子); (2) 缺乏催化剂时, 底物分子向信号报告分子转化的速率很低; (3) 产生的信号报告分子容易被检测(通常产生荧光信号或者紫外可见吸收信号); (4) 不存在明显的阻止反应. 对于荧光传感或者紫外可见吸收传感而言, 1个催化剂能够循环多次参与催化反应, 将N个非荧光或低荧光的底物分子转化为高荧光量子产率的物种, 或将N个原先在可见光区无吸收的底物分子转化为有强吸收(高摩尔吸光系数)的物种, 使之作为信号报告分子. N数值的大小可以反映催化效率的高低. 目标物可通过变构效应或内阻效应达到传感目的. 因此, 催化传感模式可极大地提高传感灵敏度.

Bonomi等^[47]报道了基于催化信号放大的蛋白酶检测方法. 由于表面含有TACN-Zn²⁺络合物, Au MPCs 21带正电荷, 当溶液中存在带负电荷的聚阴离子底物(如ATP等)时, 聚阴离子底物和HPNP竞争与表面带正电荷的Au MPCs 21结合, 当聚阴离子底物所带的负电荷数大于HPNP时, 聚阴离子底物表现出更高的亲和力, 结合了聚阴离子底物的Au MPCs 21失去了催化HPNP水解的能力. 而当酶存在时, 聚阴离子底物被催化水解成电荷数较少的小分子/离子, 导致其脱离Au MPCs 21表面, 从而恢复了Au MPCs 21催化HPNP水解的活性. 通过测量水解产物对硝基苯酚的浓度可实现对酶活性的检测(图13). 该方法可广泛应用于各种蛋白酶, 包括枯草杆菌蛋白酶A、天冬酰胺酶、谷氨酰胺酶、谷氨酸羧肽酶II和胰天蛋白酶1. 该方法的优

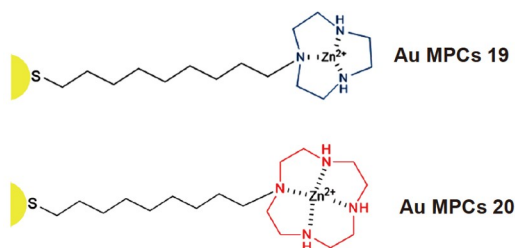


图 12 Au MPCs 19^[45]和Au MPCs 20^[51]的结构 (网络版彩图)
Figure 12 The structure of Au MPCs 19^[45] and Au MPCs 20^[51] (color online).

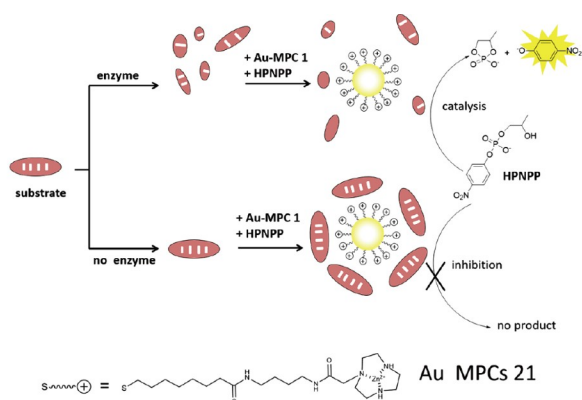


图 13 Au MPCs 21催化分析示意图^[47]. 能够水解底物的酶存在使得Au MPCs 21能够催化HPNPP的水解, 导致黄色报告分子的释放. 在没有酶的情况下, 因为酶底物是Au MPCs 21的抑制剂, Au MPCs 21的催化活性受到抑制(网络版彩图)

Figure 13 Schematic representation of the Au MPCs 21 catalytic assay ^[47]. The presence of an enzyme able to hydrolyze a substrate enables catalysis of the transphosphorylation of HPNPP by Au-MPCs 21 resulting in the release of a yellow reporter molecule. In the absence of the enzyme, the catalytic activity of Au-MPCs 21 is suppressed because the enzyme substrate acts as an inhibitor for Au MPCs 21 (color online).

点在于体系中引入催化信号放大, 使得传感有较高的灵敏度. Scrimin等^[52]认为该系统具有普遍适用性, 通过改变抑制剂的肽序列可以引入酶的选择性.

4.2 荧光指示剂置换法检测痕量阴离子

当以荧光探针做指示剂时, 荧光探针首先在Au MPCs表面通过静电吸引作用组装成化学传感体系. 由于Au MPCs对表面结合的荧光基团具有重金属淬灭效应, 可导致探针荧光淬灭. 如果加入的待识别阴离子与Au MPCs表面的结合作用更强, 荧光探针就会被外加阴离子置换出来而恢复自由状态, 导致荧光恢复, 实现对阴离子的识别.

Maiti等^[53]在Au MPCs 19的溶液中同时加入荧光探针A (香豆素343)和TDP. 探针A对Au MPCs 19的亲合力比TDP高, 故探针A与Au MPCs 19结合, 导致荧光淬灭. 加入 Hg^{2+} 后, 由于 Hg^{2+} 与碱基T之间存在高选择性的T-Hg-T作用, 导致TDP二聚化, 形成三元复合物 $\text{TDP}\cdot\text{Hg}^{2+}\cdot\text{TDP}$. 该复合物对Au MPCs 19的亲合力远高于探针A, 故可将与Au MPCs 19结合的探针A置换出来, 使得探针A荧光恢复, 从而达到荧光传感 Hg^{2+} 的目的. 该方式使得 Hg^{2+} 的检测灵敏度大大提高, 检出限可达到nM数量级. 该方法具有高选择性, Hg^{2+} 可从含有dGMP、dAMP、dCMP和TMP的混合物中选择性地

识别出TMP. 用 Ag^+ 代替 Hg^{2+} , 发现dGMP是检测 Ag^+ 的最佳识别单元^[54]. 随后他们在同一系统中将TDP和cTMP结合使用^[55], 其中TDP浓度为nM, cTMP浓度为 μM , 用于水中 Hg^{2+} 的选择性检测研究. 将一定量的 Hg^{2+} 加入到由Au MPCs 19、探针A、TDP和cTMP组成的混合溶液中, 低浓度的 Hg^{2+} 首先导致三元复合物 $\text{TDP}\cdot\text{Hg}^{2+}\cdot\text{TDP}$ 的形成, 而当TDP被耗尽后, Hg^{2+} 则开始与cTMP络合, 导致体系动态检测范围得以扩大, 实现从nM到 μM Hg^{2+} 的检测. 当将TMP替换为GMP时, 体系则对 Ag^+ 有响应. 其他金属离子几乎对这两种体系均没影响. 系统对 Hg^{2+} 或 Ag^+ 的选择性取决于核苷酸中存在碱基的类型, 故体系中可以用两个识别单元TDP和GDP来分别实现 Hg^{2+} 或 Ag^+ 混合物的同时分析.

按照类似思路, Pezzato等^[56]利用ATP的电负性大于ADP, 研究发现ATP与Au MPCs 19的亲合力大于ADP. 若底物分子与催化基头的亲合力小于ATP并大于ADP, 则ATP可以抑制催化基头的催化活性, 导致底物分子不被催化, 而ADP则相反. 由此, 可以区分ADP和ATP.

Pezzato等^[57]开发了可检测蛋白激酶活性的简单方法. 与Au MPCs 19的结合能力为 $\text{ATP} > \text{探针A (香豆素343)} > \text{ADP}$, 故在Au MPCs 19中加入探针A和ATP时, ATP与Au MPCs 19表面结合^[58], 使得探针A的荧光可被检测. 当加入蛋白激酶后, ATP被酶解转化为ADP, 导致探针A与Au MPCs 19结合, 使得其荧光淬灭. 该测定法适合于检测任何激酶的活性, 可用于体内测量.

Pezzato等^[59]通过纳米Au与多种荧光指示剂组装, 获得能够在微摩尔浓度下定量区分8种核苷酸NDP和NTP (N=A、T、G、C)的化学传感系统. 以三种荧光探针作为指示剂, 采用置换方法研究了Au MPCs 19与上述8种核苷酸的相互作用. 每个核苷酸以不同的方式与荧光探针竞争, 从而产生其特征输出信号. 研究发现, 与嘧啶核苷酸相比, 嘌呤核苷酸对Au MPCs 19具有更高的亲合力, 以及三核苷酸比二核苷酸具有更高的亲合力.

该类传感体系的优点在于, 通过纳米Au表面自组装, 便可在Au MPCs表面上构筑荧光指示剂, 从而获得荧光传感体系. 此类荧光传感体系产生的输出信号取决于分析物的化学性质及其浓度. 该体系高度模块化,

通过改变荧光指示剂或存在于单层膜中的金属离子便可容易地改变输出信号。

4.3 光照调节纳米Au的催化活性

通过改变光照的入射光波长, 能促使偶氮苯分子在顺式和反式异构体之间发生转换, 因为分子构型变化, 导致纳米Au表面修饰的催化头基之间形成催化“口袋”的有效程度受到影响, 从而可以可逆地调控纳米Au的催化活性。

Prins等^[60]利用偶氮苯分子来控制纳米酶的催化活性。以Au MPCs 19作为纳米酶模型, 在可见光下, 4-苯偶氮-苯甲酸呈顺式结构, 有利于其通过疏水作用进入Au MPCs 19表面长链部位, 可有效地破坏表面催化基头之间的催化“口袋”, 从而抑制Au MPCs 19催化HPNP的水解反应; 在紫外光下, 4-苯偶氮-苯甲酸转化为反式结构, “庞大”的结构不利于其进入纳米Au表面, 不会抑制Au MPCs 19催化HPNP的水解反应。因此, 通过改变光照入射光波长, 可有效地调控纳米Au的催化活性。光作为催化控制剂具有很强的吸引力, 因为其几乎可以瞬间传递到整个样品, 这对于创造新的递送系统、开发新材料、使用单一催化剂进行多步反应的催化剂设计以及高度依赖于粒子表面结构的生物传感具有重大意义。

5 总结与展望

本文总结了近年来基于单层保护纳米Au水解酶的研究进展。对于构筑人工模拟酶而言, Au MPCs具有诸多优势: (1) 结构简单且高度模块化, 只需修改任何结构单元即可调整功能; (2) 可以使多个反应中心靠近底物以提高效率; (3) 信号输出模块通过自组装与纳米Au结合, 制备简单; (4) 超分子结构具有可调节的表面功能, 可利用Au MPCs构建具有分子结构控制功能的纳米复合材料。

将催化单元引入纳米Au单层中, 一方面因为催化单元和Au MPCs保护单层之间的协同作用使其催化活性远高于一般催化剂; 另一方面可改变纳米Au特性, 创建高灵敏度的传感体系。此外, 含金属配体的Au MPCs因表面配位而带正电荷, 对寡聚阴离子具有较强的亲和力, 可以作为新的模型体系, 建造超分子系统, 既可建造高活性的催化体系, 也可实现痕量物质的灵敏测定。

虽然在单层保护纳米Au表面自组装催化单元, 可大大地提高其催化活性, 但目前仍存在不少挑战: (1) 与天然酶相比, 目前含催化单元的单层保护纳米Au水解酶的催化活性仍有相当大的差距。如何增加结构的复杂性, 模拟天然水解蛋白酶的肽链折叠方式, 获得高催化活性的人工模拟酶, 仍然是今后的一个发展方向; (2) 在这些人工模拟水解酶中, 纳米Au为催化单元“束缚”在其表面上提供了载体平台的作用。但是, 目前有关纳米Au尺寸对其催化活性的影响, 仍是尚未获得进展的研究方向。这个困难在于, 如何准确合成出不同尺寸的纳米Au并获得其表面修饰的催化单元数量的信息, 有效地测出催化底物反应的二级反应速率常数($k_2=k_{\text{cat}}/k_m$), 并将之进行比较。相对于其他催化常数 k_{cat} 或 k_m 而言, 使用二级反应速率常数 k_2 更能够有效地比较不同催化剂体系的催化活性大小; (3) 相对于磷酸酯水解反应的人工模拟酶的催化机理而言, 即相邻的金属配合物基团形成“催化口袋”, 通过静电吸引和疏水作用, 使之与磷酸酯底物底作用, 达到催化其水解之目的, 催化羧酸酯水解反应的人工模拟酶的催化机理仍待进一步研究。催化羧酸酯水解反应的人工模拟酶的催化单元一般为多肽或寡肽头, 通常套用天然水解酶的催化“三件套”(triad)的作用机理解释, 缺乏相应的实验事实; (4) 有关含催化单元的单层保护纳米Au水解酶的应用, 目前还是比较缺乏。相信未来会在化学、生物、医学等诸多领域有所突破。

参考文献

- Manea F, Houillon FB, Pasquato L, Scrimin P. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 6165–6169
- Dong H, Fan Y, Zhang W, Gu N, Zhang Y. *Bioconj Chem*, 2019, 30: 1273–1296
- Wei H, Wang E. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 6060–6093
- Wu J, Wang X, Wang Q, Lou Z, Li S, Zhu Y, Qin L, Wei H. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 1004–1076
- Huang Y, Ren J, Qu X. *Chem Rev*, 2019, 119: 4357–4412

- 6 Yan XY. *Prog Biochem Biophys*, 2018, 45: 101–104 (in Chinese) [阎锡蕴. 生物化学与生物物理进展, 2018, 45: 101–104]
- 7 Zhou Y, Liu B, Yang R, Liu J. *Bioconj Chem*, 2017, 28: 2903–2909
- 8 Mancin F, Prins LJ, Pengo P, Pasquato L, Tecilla P, Scrimin P. *Molecules*, 2016, 21: 1014
- 9 Gabrielli L, Prins LJ, Rastrelli F, Mancin F, Scrimin P. *Eur J Org Chem*, 2020, 2020(32): 5044–5055
- 10 Xia LW, Cheng YH, Ding L, Chen ML, Jiao Y, Xu Z. *Prog Biochem Biophys*, 2021, 45: 24–34 (in Chinese) [夏利伟, 程云辉, 丁利, 陈茂龙, 焦叶, 许宙. 生物化学与生物物理进展, 2021, 45: 24–34]
- 11 Tour JM, Jones Li LR, Pearson DL, Lamba JJS, Burgin TP, Whitesides GM, Allara DL, Parikh AN, Atre S. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 9529–9534
- 12 Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. *Chem Rev*, 2005, 105: 1103–1170
- 13 Pezzato C, Maiti S, Chen JLY, Cazzolaro A, Gobbo C, Prins LJ. *Chem Commun*, 2015, 51: 9922–9931
- 14 Scrimin P. *Nanomaterials*, 2019, 9: 1046
- 15 Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3280–3294
- 16 Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. *Chem Rev*, 2012, 112: 2739–2779
- 17 Alexander V. *Chem Rev*, 1995, 95: 273–342
- 18 Young MJ, Chin J. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 10577–10578
- 19 Macedi E, Bencini A, Caltagirone C, Lippolis V. *Coord Chem Rev*, 2020, 407: 213151
- 20 Mancin F, Scrimin P, Tecilla P. *Chem Commun*, 2012, 48: 5545–5559
- 21 Della Sala F, Chen JLY, Ranallo S, Badocco D, Pastore P, Ricci F, Prins LJ. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 10737–10740
- 22 Mancin F, Tecilla P. *New J Chem*, 2007, 31: 800–817
- 23 Diez-Castellnou M, Martinez A, Mancin F. *Adv Phys Org Chem*, 2017, 51: 129–186
- 24 Zaupa G, Mora C, Bonomi R, Prins LJ, Scrimin P. *Chem Eur J*, 2011, 17: 4879–4889
- 25 Mancin F, Prins LJ, Scrimin P. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2013, 18: 61–69
- 26 Zhang JJ, Shao Y, Wei L, Li Y, Sheng X, Liu F, Lu GY. *Sci Sin Chim*, 2009, 39: 194–207 (in Chinese) [张晶晶, 邵莺, 韦丽, 李英, 盛欣, 刘芳, 陆国元. 中国科学B辑: 化学, 2009, 39: 194–207]
- 27 Diez-Castellnou M, Salassa G, Mancin F, Scrimin P. *Front Chem*, 2019, 7: 469
- 28 Czeszlik J, Zamolo S, Darbre T, Mancin F, Scrimin P. *Molecules*, 2019, 24: 2814
- 29 Czeszlik J, Zamolo S, Darbre T, Rigo R, Sissi C, Scrimin P. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 2–12
- 30 Diez-Castellnou M, Mancin F, Scrimin P. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 1158–1161
- 31 Chen JLY, Pezzato C, Scrimin P, Prins LJ. *Chem Eur J*, 2016, 22: 7028–7032
- 32 Bonomi R, Selvestrel F, Lombardo V, Sissi C, Polizzi S, Mancin F, Tonellato U, Scrimin P. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 15744–15745
- 33 Feng G, Mareque-Rivas JC, Torres Martín de Rosales R, Williams NH. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 13470–13471
- 34 Tirel EY, Williams NH. *Chem Eur J*, 2015, 21: 7053–7056
- 35 Bonomi R, Scrimin P, Mancin F. *Org Biomol Chem*, 2010, 8: 2622–2626
- 36 Mikolajczak DJ, Berger AA, Kokschi B. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 8776–8785
- 37 Pengo P, Polizzi S, Pasquato L, Scrimin P. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 1616–1617
- 38 Pengo P, Baltzer L, Pasquato L, Scrimin P. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 400–404
- 39 Zaramella D, Scrimin P, Prins LJ. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8396–8399
- 40 Mikolajczak DJ, Kokschi B. *ChemCatChem*, 2018, 10: 4324–4328
- 41 Mikolajczak DJ, Heier JL, Schade B, Kokschi B. *Biomacromolecules*, 2017, 18: 3557–3562
- 42 Mikolajczak DJ, Scholz J, Kokschi B. *ChemCatChem*, 2018, 10: 5665–5668
- 43 Mikolajczak DJ, Kokschi B. *Catalysts*, 2019, 9: 903
- 44 Bunz U, Rotello V. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3268–3279
- 45 Pieters G, Cazzolaro A, Bonomi R, Prins LJ. *Chem Commun*, 2012, 48: 1916–1918
- 46 Prins LJ. *Acc Chem Res*, 2015, 48: 1920–1928
- 47 Bonomi R, Cazzolaro A, Sansone A, Scrimin P, Prins LJ. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 2307–2312
- 48 Pieters G, Pezzato C, Prins LJ. *Langmuir*, 2013, 29: 7180–7185

- 49 Pieters G, Pezzato C, Prins LJ. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 15289–15292
- 50 Martin SG, Prins LJ. *Chem Commun*, 2016, 52: 9387–9390
- 51 Della Sala F, Maiti S, Bonanni A, Scrimin P, Prins LJ. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 1611–1615
- 52 Scrimin P, Prins LJ. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 4488
- 53 Maiti S, Pezzato C, Garcia Martin S, Prins LJ. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 11288–11291
- 54 Maiti S, Prins LJ. *Chem Commun*, 2015, 51: 5714–5716
- 55 Maiti S, Prins LJ. *Tetrahedron*, 2017, 73: 4950–4954
- 56 Pezzato C, Chen JLY, Galzerano P, Salvi M, Prins LJ. *Org Biomol Chem*, 2016, 14: 6811–6820
- 57 Pezzato C, Zaramella D, Martinelli M, Pieters G, Pagano MA, Prins LJ. *Org Biomol Chem*, 2015, 13: 1198–1203
- 58 Pezzato C, Prins LJ. *Nat Commun*, 2015, 6: 7790
- 59 Pezzato C, Lee B, Severin K, Prins LJ. *Chem Commun*, 2013, 49: 469–471
- 60 Neri S, Garcia Martin S, Pezzato C, Prins LJ. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 1794–1797

Development of monolayer-protected gold clusters-based hydrolytic nanozymes containing catalytic units

Fang Li, Shuaibing Li, Meixia Yao, Jiangshan Shen*

College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

*Corresponding author (email: jssh@hqu.edu.cn)

Abstract: Nanozymes can catalyze the biochemical reactions mediated by natural enzymes under physiological conditions, and show natural enzymes-like reaction kinetics and catalytic mechanism. Monolayer-protected gold clusters (Au MPCs) containing catalytic units can greatly improve the catalytic abilities of nanozymes, so it has been developed rapidly in recent years. In this review, the progress of Au MPCs hydrolytic nanozymes containing catalytic units in recent years is summarized. The design of surface catalytic units, supramolecular assembly and application of Au MPCs hydrolytic nanozymes are discussed.

Keywords: Au MPCs, catalytic reactions, artificial hydrolytic enzymes

doi: 10.1360/SSC-2021-0097