

多肽在金纳米粒子表面偶联反应效率研究

张 强 李瑞雪 陈 鑫 何兴兴 韩爱玲 方国臻 刘继锋* 王 硕*
(食品营养与安全教育部重点实验室,天津科技大学,天津 300457)

摘 要 通过 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)与 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化反应将多肽偶联到金纳米粒子表面,采用荧光光谱研究其形成的酰胺键的反应偶联效率。考察了实验条件,包括缓冲液的种类(HEPES、Tris-HCl、硼酸、PBS 缓冲液)、pH 值(pH 6.5 ~ 9.0)、缓冲液浓度(10, 25, 40 和 50 mmol/L)、NHS 和 EDC 的浓度(NHS 0.2 ~ 1.0 mol/L, EDC 0.01 ~ 0.5 mol/L)及二者比例(0, 0.5, 1.0, 2.0 和 2.5)、偶联反应时间(4, 8, 12, 24 和 36 h)等对偶联效率的影响,筛选出最佳实验条件。实验结果表明,25 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液(pH 7.0),NHS/EDC 浓度为 0.4 mol/L/0.2 mol/L 和 24 h 的反应时间为 EDC-NHS 活化反应将多肽偶联到金纳米粒子上的最佳实验条件。本研究结果可为相关研究提供技术参考。

关键词 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺; *N*-羟基琥珀酰亚胺; 金纳米粒子; 多肽

1 引言

金纳米粒子具有独特的光学性质,如表面等离子体共振、共振光散射、表面易于修饰以及较好的生物相容性,多肽或蛋白质偶联到金纳米粒子表面形成的组合体在化学、生物学、医学等方面有很多潜在的应用价值^[1-3]。多肽和金纳米粒子结合体已用于生物模拟系统中的免疫识别^[4]、转录因子^[5,6]、模拟酶^[7]和蛋白抑制剂^[8]的研究。将多肽偶联到金纳米粒子表面,通过 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的活化反应是最常用的偶联方法,一般需两步活化反应:首先,含有巯基的烷酸等通过金硫键组装到金纳米粒子表面,形成单分子层;然后,羧基通过 EDC-NHS 的活化,再与多肽或蛋白质的氨基发生脱水缩合反应,形成酰胺键^[5,6,9,10]。EDC-NHS 活化反应有很多优点,如温和的反应条件、良好的生物相容性、对生物分子影响小和相对单一的产物^[11]。但是不同研究组采用了不同的实验条件,包括不同的 EDC 和 NHS 的相对浓度、缓冲液及 pH 值等^[12-15]。有文献报道含有羧基的聚合物被 EDC 和 NHS 活化的条件及产物种类取决于聚合物中的官能团结构^[16,17];也有的研究表明,基底的形态也会影响 EDC-NHS 的偶联效率^[13]。但是由于在偶联过程中金纳米粒子的不稳定性、中间物的水解及低的偶联效率等原因,通过 EDC-NHS 活化反应将多肽或蛋白质偶联到金纳米粒子上仍然具有很多不确定性^[13,17]。因此,系统研究多肽与金纳米粒子结合形成组合体的实验条件,具有重要的实际参考价值。多肽或者蛋白质在金纳米粒子上的偶联,基于 EDC-NHS 活化策略的羧基和的缩合反应包括 3 个步骤:(1)EDC 首先和羧基反应,生成第一个中间产物 O-酰基异脲,O-酰基异脲很容易水解再产生羧酸;(2)O-酰基异脲与 NHS 反应转化为稳定性更高的中间物 NHS-酯,并且 NHS-酯更易于和多肽或蛋白质中的氨基反应形成酰胺键;(3)NHS-酯和 O-酰基异脲都能与多肽或蛋白质中的氨基反应形成酰胺键,多肽或者蛋白质等含氨基的生物分子被固定在表面(图 1)。由于这些中间产物容易水解,这就要求偶联步骤要尽可能的简单。

本研究采用一步偶联法,即向修饰的金纳米粒子和多肽的混合液中同时加入 EDC 和 NHS 进行偶联反应。首先合成了 20 nm 的金纳米粒子,利用透射电镜和紫外光谱对金纳米粒子进行表征。选用罗丹明 B 标记的多肽 SHELKCLKL 作为模型分子,考察了其偶联到巯基十一酸修饰的金纳米粒子上的偶联条件,此多肽和纳米粒子的组合体具有水解酶活性^[22],因此选择其作为模板研究偶联反应效率。通过测定荧光强度量化偶联反应后的组合体的荧光强度,从而定量偶联反应效率,考察了包括缓冲液种

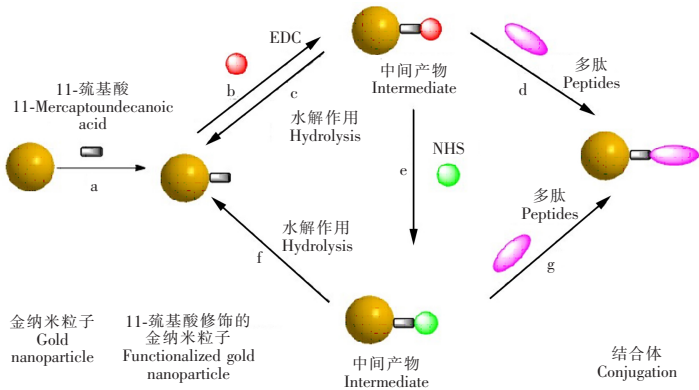


图 1 多肽与 11-巯基十一酸修饰的金纳米粒子的偶联反应机理。(a) 11-巯基十一酸修饰金纳米粒子。(b) 羧酸化的金纳米粒子与 EDC 反应产生 O-酰基异脲。(c) 不稳定的 O-酰基异脲水解生成羧酸。(d) 不稳定 O-酰基异脲与多肽或者蛋白质的氨基反应形成结合体。(e) 不稳定 O-酰基异脲转化为 NHS-酯。(f) NHS-酯水解生成羧酸。(g) NHS-酯易于与多肽或者蛋白质的氨基反应形成酰胺键。

Fig.1 Mechanism of coupling peptides to gold nanoparticles. (a) Gold nanoparticles are modified with 11-mercaptopundecanoic acid. (b) The carboxylic acid on modified gold nanoparticles reacts with 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) to produce the first intermediate of O-acylisourea. (c) The unstable O-acylisourea is hydrolyzed to regenerate carboxylic acid. (d) The unstable O-acylisourea reacts with the amino group of peptide to form the conjugation. (e) The unstable O-acylisourea is also converted to N-hydroxysuccinimide (NHS)-ester by reaction with NHS. (f) The NHS-ester can also be hydrolyzed to regenerate carboxylic acid. (g) The NHS-ester inclines to react with the amino group of peptide to form the conjugation.

类、pH 值及浓度、EDC 和 NHS 的浓度及其比例、偶联反应的时间等对反应效率的影响,确定金纳米粒子表面偶联多肽的最佳实验条件。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

TU-1901 紫外分光光度计(北京普析通用仪器公司);TG16-II 离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);JEM-2010 FEF 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);F-2500 荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司)。1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC,99%,北京百灵威科技有限公司);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,98%,阿拉丁公司);氯金酸(美国 Sigma-Aldrich 公司);柠檬酸钠(98%,国药集团化学试剂有限公司);罗丹名 B 标记的多肽 N-SHELKLKLKL-C(98%,上海波泰生物科技有限公司);其它试剂均为分析纯。

2.2 金纳米粒子的制备及修饰

参照文献[18~21]报道的方法合成金纳米粒子,具体方法如下:取 100 mL 0.25 mmol/L 氯金酸于 200 mL 三口烧瓶(带回流装置)中,在搅拌下加热到沸腾,迅速加入 2.374 mL 5% 的柠檬酸钠,搅拌下持续加热回流 20 min,然后冷却至室温。取 4 mL 金纳米粒子溶液,加入 1 mL 11-巯基十一酸的无水乙醇溶液,孵育 24 h 后,离心除去未反应的 11-巯基十一酸,得到 11-巯基十一酸修饰的金纳米粒子。

2.3 EDC-NHS 偶联反应

向 1 mL 11-巯基十一酸修饰的金纳米粒子溶液中加入 20 μL 罗丹明 B 标记的多肽 SHELKLKLKL (10 mg/mL),然后加入 500 μL EDC-NHS 混合液,反应 24 h。离心洗涤 3 次(9500 r/min,20 min),除去未反应的多肽。通过预实验初步确定实验条件,在此基础上详细考察各实验参数对偶联效率的影响,每次实验均在上一次所测产物荧光强度最大实验条件基础上进行(实验条件见表 1)。

表 1 多肽-金纳米粒子偶联反应考察实验条件
Table 1 Experimental conditions of coupling peptide with gold nanoparticles investigated in this study

实验条件 Experimental condition	缓冲液种 Buffer solution	缓冲液浓度 Buffer solution concentration	pH	NHS/EDC 浓度 NHS/EDC concentration	反应时间 Reaction time (h)
缓冲液种类影响 Effect of buffer solution type	—	25 mmol/L	8.0	0.2 mol/L/ 0.1 mol/L	24
缓冲液浓度影响 Effect of Buffer Solution Concentration	HEPES	—	8.0	0.2 mol/L/ 0.1 mol/L	24
NHS/EDC 比例影响 Effect of ratio of NHS/EDC	HEPES	25 mmol/L	8.0	—	24
NHS/EDC 浓度影响 Effect of NHS/EDC concentration	HEPES	25 mmol/L	8.0	—	24
pH 影响 Effect of pH	HEPES	25 mmol/L	—	0.4 mmol/L/ 0.2 mol/L	24
反应时间影响 Effect of reaction time	HEPES	25 mmol/L	7.0	0.4 mol/L/ 0.2 mol/L	—

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; EDC: 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride; NHS: N-hydroxysuccinimide.

2.4 仪器测量

在 350 ~ 800 nm 范围内测定紫外-可见吸收光谱。采用透射电镜表征金纳米粒子的形貌,加速电压 200 kV。测定荧光光谱时,激发波长 555 nm,发射波长 580 nm,狭缝宽度 5 nm。

3 结果与讨论

3.1 缓冲液对偶联效率的影响

金纳米粒子的 TEM 图和紫外-可见吸收光谱图如图 2 所示。在 第一组实验中,对 pH 8.0, 25 mmol/L 的 4 种常用缓冲液(HEPES、Tris-HCl、硼酸、PBS)对偶联反应的影响进行了研究。图 3 表明,缓冲液种类对最终得到的多肽偶联金纳米粒子的荧光强度也就是偶联效率影响较大,在 HEPES 中进行的偶联得到的产物具有最高的荧光强度,表明在这 4 种缓冲液中,HEPES 有利于多肽在金纳米粒子表面的偶联反应,其强度比硼酸、Tris-HCl 缓冲液分别提高 10% 和 30%。在 PBS 缓冲液中进行的偶联具有最低的荧光强度,表明 EDC-NHS 偶联反应在 PBS 缓冲液效率最低。

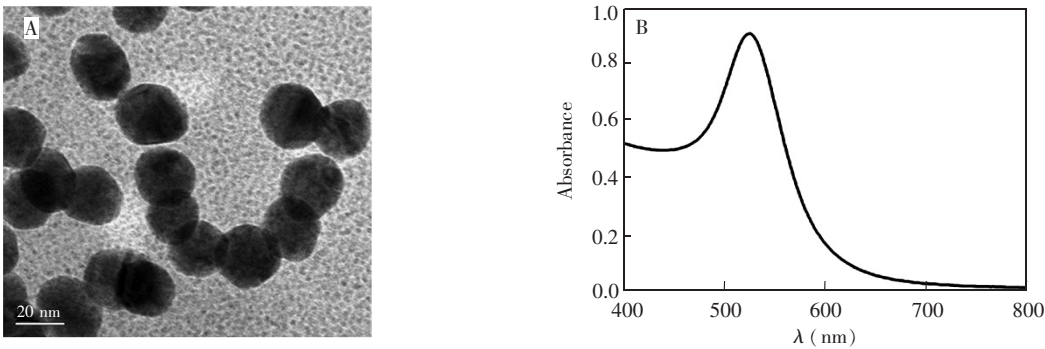


图 2 金纳米粒子的透射电镜图(A)和紫外-可见吸收光谱图(B)
Fig.2 (A) Transmission electron microscopic (TEM) image of gold nanoparticles (AuNPs), (B) UV-vis spectra of AuNPs

3.2 缓冲液浓度对偶联效率的影响

考察了 10、25、40 和 50 mmol/L 的 HEPES 缓冲液中多肽与金纳米离子的偶联效率(图 4)。结果表明,在 25 mmol/L HEPES 缓冲液中进行的 EDC-NHS 偶联反应,得到的荧光标记多肽-金纳米粒子复合物的荧光强度最高。

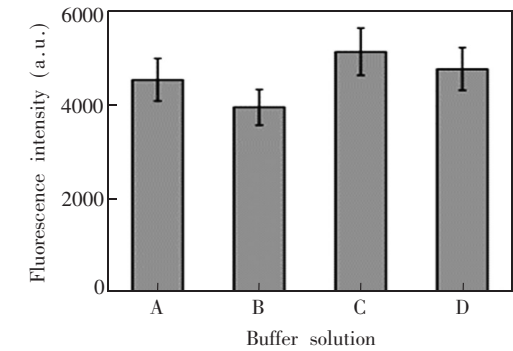


图 3 不同缓冲液对偶联效率影响的荧光强度 (A)Tris-HCl 缓冲液; (B)PBS 缓冲液; (C)HEPES 缓冲液; (D)硼酸缓冲液。实验条件:pH 8.0;缓冲液浓度25 mmol/L; NHS/EDC 浓度: 0.2 mol/L/0.1 mol/L; 反应时间 24 h。

Fig. 3 Fluorescent intensity of dye-labeled peptide-AuNPs and EDC-NHS coupling conducted in different buffer solutions. (A) Tris-HCl buffer solution; (B) PBS buffer solution; (C) HEPES buffer solution; (D) Sodium borate buffer solution. Experiment conditions: pH 8.0; concentration, 25 mmol/L; concentration of NHS/EDC, 0.2mol/L/0.1 mol/L; reaction time, 24 h

3.3 NHS/EDC 的比例对偶联效率的影响

NHS/EDC 的比例对偶联效率有很大影响,文献报道的研究中采用的比例不尽相同^[12,14],但对于多肽偶联到金纳米粒子表面的反应中二者的浓度比例并没有系统研究。本实验考察了不同摩尔比(0,0.5,1.0,2.0,2.5)的 NHS 和 EDC 对多肽偶联效率的影响(图 5)。结果表明,随 NHS/EDC 的浓度比从0.5 增加到2.0,得到的复合金纳米粒子的荧光强度持续增强;浓度比为 2.5 时荧光强度反而下降。因此,偶联反应中 NHS/EDC 的最佳浓度比为 2.0,此时偶联到修饰金纳米粒子表面的多肽数量最多。

3.4 NHS/EDC 的浓度对偶联效率的影响

EDC 和 NHS 的浓度是影响偶联效率的另一个关键因素。考察了不同 NHS 和 EDC 浓度(NHS 0.2 ~ 1.0 mol/L, EDC 0.01 ~ 0.5 mol/L)对偶联效率的影响。如图 6 所示,随着 NHS/EDC 浓度从 0.2 mol/L/0.01 mol/L 增加到 0.4 mol/L/0.2 mol/L,多肽偶联的金纳米粒子的荧光强度也逐渐增加;浓度继续增大,复合金纳米粒子的荧光强度开始逐渐减弱。结果表明,使用 0.2 mol/L EDC/0.4 mol/L NHS 时,多肽 SHELKLKCLKL 在金纳米粒子表面具有最高的偶联效率。此结果与文献[13]报道的实验结果 EDC 0.1 mol/L 和 NHS 0.2 mol/L 不一致,这可能是由于不同的修饰载体需要不同的活化浓度。

3.5 缓冲液 pH 值对偶联效率的影响

文献[12]表明,缓冲液 pH 值对于 EDC-NHS 偶联效率有重大的影响。文献[5]报道的 EDC-NHS 偶联反应分为两步:羧基的活化在弱酸性缓冲液中进行,偶联多肽在弱碱性缓冲液中进行。为了减小水

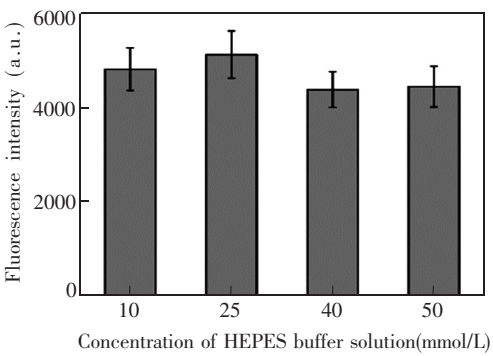


图 4 不同浓度 HEPES 缓冲液对偶联效率影响 pH 8.0, NHS/EDC 浓度: 0.2 mol/L/0.1 mol/L,反应时间 24 h

Fig. 4 Fluorescence intensity of dye labeled peptide-AuNPs and EDC-NHS coupling conducted in different concentration of HEPES buffer solutions. Experiment conditions: pH 8.0, concentration of NHS/EDC, 0.2 mol/L/0.1 mol/L; reaction time, 24 h.

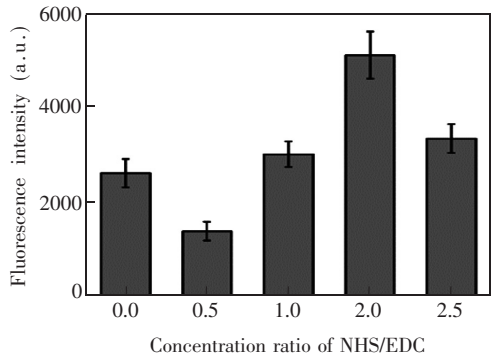


图 5 NHS 与 EDC 的浓度比例对偶联效率影响 25 mmol/L HEPES 缓冲液, pH 8.0;反应时间 24 h。

Fig. 5 Fluorescence intensity of dye labeled peptide-AuNPs and EDC-NHS coupling conducted with different ratios of NHS/EDC. Experimental conditions: 25mmol/L HEPES buffer solution, pH 8.0; reaction time, 24 h.

解的几率和增加金纳米粒子的稳定性,本研究中只采用一种缓冲液,通过一步法进行偶联。考察了 HEPES 缓冲液 pH 值 (pH 6.5 ~ 9.0) 对偶联效率的影响。结果如图 7 所示,在 pH 7.0 条件下,偶联了多肽的金纳米粒子具有最高的荧光强度,即偶联效率最高。

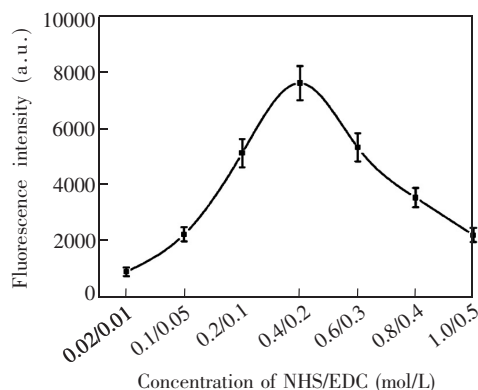


图 6 NHS 和 EDC 的浓度对偶联效率影响的荧光强度。25 mmol/L HEPES 缓冲液, pH 8.0; 反应时间 24 h。

Fig. 6 Fluorescence intensity of dye labeled peptide-AuNPs and EDC-NHS coupling conducted with different concentrations of EDC-NHS. Experimental conditions: 25 mmol/L HEPES buffer solution, pH 8.0; reaction time, 24 h.

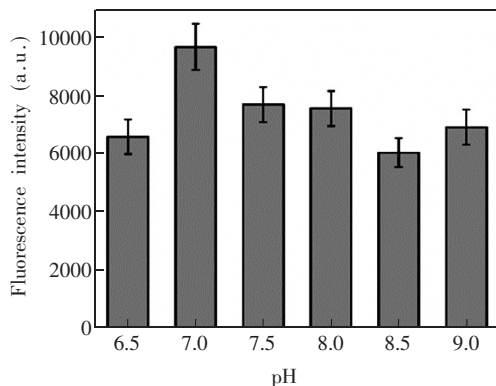


图 7 缓冲溶液 pH 值对偶联效率的影响。25 mmol/L HEPES 缓冲液, NHS/EDC 浓度为 0.4 mol/L/0.2 mol/L, 反应时间 24 h

Fig. 7 Fluorescence intensity of dye labeled peptide-AuNPs and EDC-NHS coupling conducted in HEPES buffer solutions with different pH. Experimental conditions: 25 mmol/L HEPES buffer solution, NHS/EDC: 0.4 mol/L/0.2 mol/L; reaction time: 24 h.

3.6 反应时间对偶联效率的影响

不同偶联时间(4, 8, 12, 24 和 36 h)得到多肽-金纳米粒子复合物的荧光强度如图 8 所示。随着时间延长,荧光强度不断增加,24 h 时达到最大值,继续延长时间,荧光强度基本不变,在偶联反应 4, 8, 12 和 36 h 时,得到的多肽-近纳米粒子的荧光强度分别为最大荧光强度的 68%, 72%, 78% 和 100%。

因此,荧光标记多肽 SHELKCLKLKL 偶联到金纳米粒子上的最佳实验条件为: pH 7.0, 25 mmol/L HEPES 缓冲液, NHS/EDC 浓度为 0.4 mol/L/0.2 mol/L, 反应时间 24 h。

4 结论

随着纳米技术的快速发展,多肽与纳米粒子的组合材料在生命科学、临床医药和化学材料等反面的应用越来越多,因此多肽分子与纳米颗粒的偶联方法和偶联效率的研究愈加重要。本研究通过 EDC-NHS 活化反应将 SHELKCLKLKL 偶联到金纳米粒子上,利用荧光光谱考察了实验条件对偶联反应效率的影响,包括缓冲液的种类、缓冲液的 pH 值及浓度、EDC 和 NHS 的浓度及其比例、偶联反应的时间等,得到最佳的实验条件为: pH 7.0, 25 mmol/L HEPES 缓冲液, NHS 浓度为 0.4 mol/L, EDC 浓度为 0.2 mol/L, 反应时间 24 h。本研究为采用 EDC-NHS 活化反应偶联制备金纳米粒子与多肽或蛋白质复合体的研究提供了重要参考。

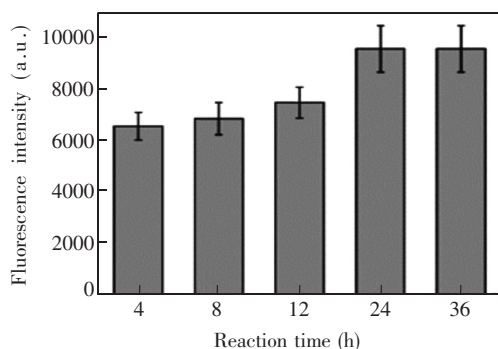


图 8 不同的反应时间对偶联效率影响的荧光强度。25 mmol/L HEPES 缓冲液, pH 7.0; NHS/EDC 浓度为 0.4 mol/L/0.2 mol/L。

Fig. 8 Fluorescence intensity of dye labeled peptide-AuNPs and EDC-NHS coupling conducted for reaction time. Experimental conditions. 25 mmol/L HEPES buffer (pH 7.0); NHS/EDC: 0.4 mol/L/0.2 mol/L.

References

- 1 Wang Z, Coord M L. *Chem. Rev.*, **2009**, 253(11-12): 1607–1618
- 2 Sperling R A, Rivera G I, ZHANG F, Zanella M, Parak W J. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37(9): 1896–1908
- 3 Giljohann D A, Seferos D S, Daniel W L, Massich M D, Patel P C, Mirkin C A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49(19): 3280–3294
- 4 Harkness K M, Turner B N, Agrawal A C, ZHANG Y, McLean J A, Cliffel D E. *Nanoscale*, **2012**, 4(13): 3843–3851
- 5 Patel S, Jung D, Yin P T, Carlton P, Yamamoto M, Bando T, Sugiyama H, Lee K B. *ACS Nano*, **2014**, 8(9): 8959–8967
- 6 Patel S, Yin P T, Sugiyama H, Lee K B. *ACS Nano*, **2015**, 9(7): 6909–6917
- 7 Zaramella D, Scrimin P, Prins L J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(20): 8396–8399
- 8 An D, Su J, Weber J K, Gao X, Zhou R, Li J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(26): 8412–8418
- 9 Bartczak D, Kanaras A G. *Langmuir*, **2010**, 26(10): 7072–7077
- 10 Rong G, Wang H, Skewis L R, Reinhard B M. *Nano Lett.*, **2008**, 8(10): 3386–3393
- 11 Wang C, Yan Q, Liu H, Zhou X, Xiao S. *Langmuir*, **2011**, 27(19): 12058–12068
- 12 Sam S, Touahir L, Andresa S J, Allongue P, Chazalviel J N, Gouget-Laemmel A C, Henry de Villeneuve C, Moraillon A, Ozanam F, Gabouze N, Djebbar S. *Langmuir*, **2010**, 26(2): 809–814
- 13 Bartczak D, Kanaras A G. *Langmuir*, **2011**, 27(16): 10119–10123
- 14 Wang K, Zhang R, Sun N, Li X, Wang J, Cao Y, Pei R. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8(39): 25834–25839
- 15 Sun N, Liu M, Wang J, Wang Z, Li X, Jiang B, Pei R. *Small*, **2016**, 12(36): 5090–5097
- 16 Yan Q, Zheng H, Jiang C, Li K, Xiao S. *RSC Adv.*, **2015**, 5(86): 69939–69947
- 17 Totaro K A, LIAO X, Bhattacharya K, Finneman J I, Sperry J B, Massa M A, Thorn J, Ho S V, Pentelute B L. *Bioconjugate Chem.*, **2016**, 27(4): 994–1004
- 18 Haiss W, Thanh N, Aveyard J, Fernig D G. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(11): 4215–4221
- 19 Hurst S J, Lytton-Jean A, Mirkin C A. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(24): 8313–8318
- 20 Ji X, Song X, Li J, Bai Y, Yang W, Peng X. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129(14): 13939–13948
- 21 Bellino M G, Calvo E J, Gordillo G. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2004**, 6(2): 424–428
- 22 Zhang Q, He X, Han A, Tu Q, Fang G, Liu J, Wang S, Li H. *Nanoscale*, **2016**, 8(38): 16851–16856

Study of Efficiency of Coupling Peptides with Gold Nanoparticles

ZHANG Qiang, LI Rui-Xue, CHEN Xin, HE Xing-Xing, Han Ai-Ling,

FANG Guo-Zhen, LIU Ji-Feng*, WANG Shuo*

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education of China,

Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract Fluorescence spectroscopy was used to investigate the efficiency of coupling peptides to gold nanoparticles via 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride-*N*-hydroxysuccinimide (EDC-NHS). The experiment conditions including buffer solution, pH value and concentrations of buffer solution, concentrations of NHS and EDC, concentration ratios of NHS to EDC, and coupling reaction time on the coupling efficiency were investigated and optimized. The experimental results indicated that the optimized experimental conditions were as follows: 25 mmol/L HEPES buffer solution, pH 7.0; 2:1 of concentration ratio of NHS to EDC, 0.4 mol/L NHS, 0.2 mol/L EDC, and coupling reaction time of 24 h. This study may provide references for the relative research involving coupling peptide or protein with gold nanoparticles

Keywords 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride; *N*-Hydroxysuccinimide; Gold nanoparticles; Peptides

(Received 1 November 2016; accepted 16 February 2017)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China ((No. 21575102)).