

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108067309 A

(43)申请公布日 2018.05.25

(21)申请号 201611000276.5

(22)申请日 2016.11.14

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 阎锡蕴 范克龙 高利增 段德民

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 穆彬

(51)Int.Cl.

B01J 31/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

优化纳米酶颗粒活性的方法

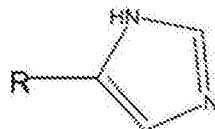
(57)摘要

本发明提供了一种优化纳米酶颗粒活性的方法,具体是利用含咪唑环的小分子化合物进行修饰,以改善其对底物 H_2O_2 的亲合力,从而实现纳米酶颗粒活性优化。通过本发明的方法,将纳米酶颗粒对底物 H_2O_2 的亲合力提高了12倍,将纳米酶颗粒的催化效率提高了21倍。本发明通过对天然酶活性中心的模拟,实现对纳米酶颗粒活性的优化,将会对纳米酶颗粒的活性优化提供更多的新方法,并推动纳米酶颗粒在生物纳米技术领域的实际应用。

1. 一种活性优化的纳米酶颗粒,所述活性优化的纳米酶颗粒通过将纳米酶颗粒用含有咪唑环的化合物修饰获得。

2. 根据权利要求1所述的活性优化的纳米酶颗粒,其中所述纳米酶颗粒选自 Fe_3O_4 纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、双金属合金纳米颗粒和氧化铈纳米颗粒或其任意组合。

3. 根据权利要求1所述的活性优化的纳米酶颗粒,其中所述含有咪唑环的化合物如下式所示



其中R选自 $\text{C}_1\text{-C}_7$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_7$ 烷氧基、 $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}-\text{NO}_2$ 。

4. 根据权利要求1所述的活性优化的纳米酶颗粒,其中所述含有咪唑环的化合物选自组氨酸、组胺、硝基咪唑或其任意组合。

5. 一种获得权利要求1-3中任一项所述的活性优化的纳米酶颗粒的方法,所述方法包括合成所述纳米酶颗粒,同时在合成的过程中加入含有咪唑环的化合物。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述合成为水热法合成。

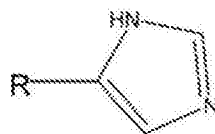
7. 一种优化纳米酶颗粒的方法,所述方法包括用含有咪唑环的化合物修饰纳米酶颗粒。

8. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其中所述纳米酶颗粒选自 Fe_3O_4 纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、双金属合金纳米颗粒和氧化铈纳米颗粒或其任意组合。

9. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法,

其中

所述含有咪唑环的化合物如下式所示



其中R选自 $\text{C}_1\text{-C}_7$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_7$ 烷氧基、 $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}-\text{NO}_2$ 。

10. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其中所述含有咪唑环的化合物选自组氨酸、组胺、硝基咪唑或其任意组合。

优化纳米酶颗粒活性的方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料学、纳米生物学和纳米医学研究领域。更具体而言,本发明提供了一种新的优化纳米酶颗粒的方法。

背景技术

[0002] 自20世纪中期以来,为了弥补天然酶在实际应用中的一些缺陷,人工合成酶或者模拟酶已经引起了研究人员的极大兴趣。但是,因为人工合成材料的低活性和低选择性,大大的限制了人工模拟酶的应用范围。构建理想的人工模拟酶仍然面临很多挑战。最近,发明人发现,无机 Fe_3O_4 纳米颗粒等本身就具有内在的酶活性¹,并将这种具有内在酶活性的纳米材料称为纳米酶颗粒²。作为纳米酶颗粒中的典型代表, Fe_3O_4 纳米酶颗粒的报道,引领了纳米酶颗粒研究的热潮,陆续有近百种纳米颗粒的不同纳米酶颗粒活性被陆续报道^{3,4},并被广泛的应用于生物纳米技术领域,比如生物传感、生物成像、组织工程、肿瘤的诊断和治疗等等⁵⁻⁷。尽管纳米酶颗粒的具有很高的酶催化活性,但是在实际的应用过程中,其催化效率及对底物的选择性仍然需要进一步的优化²。现在对纳米酶颗粒优化的方法主要集中在对纳米颗粒纳米尺度的控制,包括尺寸、结构、形貌、掺杂以及表面电荷修饰等等,这些方法对纳米酶颗粒活性的改善都存在一定的局限性,并不具有普适性。因此,需要建立一种新的优化纳米酶颗粒活性的方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种活性优化的纳米酶颗粒,获得所述活性优化的纳米酶颗粒的方法及其优化纳米酶颗粒的方法。

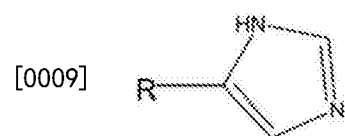
[0004] 本发明人通过分析天然酶的活性结构中心,通过确定对活性中心起决定性作用的氨基酸为组氨酸,同时分析组氨酸的关键作用基团咪唑环,并利用包含咪唑环的化合物模拟组氨酸修饰纳米酶颗粒表面来实现纳米酶颗粒的优化。

[0005] 本发明所述的纳米酶颗粒包含所有具有内在酶活性的纳米颗粒,在本发明中优选指 Fe_3O_4 纳米颗粒。

[0006] 具体而言,本发明的第一个方面提供一种活性优化的纳米酶颗粒,所述活性优化的纳米酶颗粒通过将纳米酶颗粒用含有咪唑环的化合物修饰获得。

[0007] 在优选的实施方案中,所述纳米酶颗粒选自 Fe_3O_4 纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、双金属合金纳米颗粒和氧化铈纳米颗粒或其任意组合。

[0008] 在优选的实施方案中,所述含有咪唑环的化合物如下式所示



[0010] 其中R选自 $\text{C}_1\text{-C}_7$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_7$ 烷氧基、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}-\text{NO}_2$ 。

[0011] 在优选的实施方案中,所述含有咪唑环的化合物选自组氨酸、组胺、硝基咪唑或其任意组合。

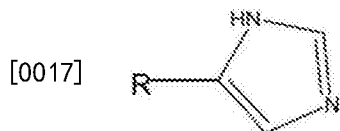
[0012] 本发明的第二个方面提供一种获得本发明第一方面所述的活性优化的纳米酶颗粒的方法,所述方法包括合成所述纳米酶颗粒,同时在合成的过程中加入所述含有咪唑环的化合物。

[0013] 在优选的实施方案中,所述合成为水热法合成。

[0014] 本发明的第三个方面提供一种优化纳米酶颗粒的方法,所述方法包括用含有咪唑环的化合物修饰所述纳米酶颗粒。

[0015] 在优选的实施方案中,所述纳米酶颗粒选自 Fe_3O_4 纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、双金属合金纳米颗粒和氧化铈纳米颗粒或其任意组合。

[0016] 在优选的实施方案中,所述含有咪唑环的化合物如下式所示



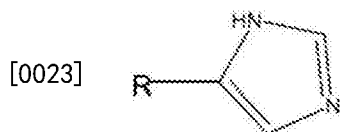
[0018] 其中R选自 C_1 - C_7 烷基、 C_1 - C_7 烷氧基、 $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}-\text{NO}_2$ 。

[0019] 在优选的实施方案中,所述含有咪唑环的化合物选自组氨酸、组胺、硝基咪唑或其任意组合。

[0020] 其中,术语“活性优化的”是指改善纳米酶颗粒对底物 H_2O_2 的亲合力,与原纳米酶颗粒相比,提供更高的催化效率。

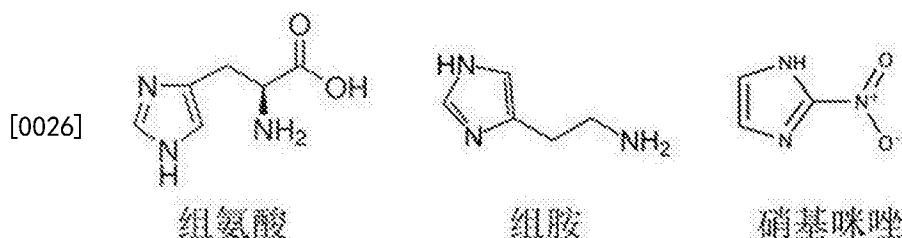
[0021] 术语“纳米酶颗粒”是指所有具有内在酶活性的纳米颗粒,在本发明中特别指金属氧化物纳米颗粒,例如 Fe_3O_4 纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、双金属合金纳米颗粒和氧化铈纳米颗粒或其任意组合。

[0022] 术语“含有咪唑环的化合物”是指含有咪唑环结构的任何化合物,具体可以包括组氨酸、组胺、硝基咪唑或其任意组合。其中含咪唑环的化合物结构如下式所示:



[0024] 其中R选自 C_1 - C_7 烷基、 C_1 - C_7 烷氧基、 $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}-\text{NO}_2$ 。

[0025] 在优选的实施方案中,所述含咪唑环的化合物选自以下各项:



[0027] 术语“水热法”又称热液法,是指在密封的压力容器中,以液体为溶剂,在高温高压的条件下进行的合成磁颗粒的方法⁸。

[0028] 本发明通过对天然辣根过氧化物酶(HRP)的结构及其活性中心的研究,发现对其

催化活性中心起关键作用的氨基酸。通过模拟这种氨基酸修饰,将纳米酶颗粒对底物 H_2O_2 的亲合力提高了12倍,将纳米酶颗粒的催化效率提高了21倍。本发明通过对天然酶活性中心的模拟,实现对纳米酶颗粒活性的优化,将会对纳米酶颗粒的活性优化提供更多的新方法,并推动纳米酶颗粒的在生物纳米技术领域的实际应用。

附图说明

- [0029] 图1对组氨酸修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的表征。
- [0030] A. 对不同修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的TEM及SEM表征;
- [0031] B. 对氨基酸修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的XPS表征。
- [0032] 图2组氨酸修饰可以显著性得提高底物 H_2O_2 结合到 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的 K_M 值。
- [0033] A. 相同条件下,随着时间变化的过氧化物酶催化反应曲线。
- [0034] B. 米氏反应方程分析。
- [0035] 图3组胺修饰可以显著性的提高 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的催化活性

具体实施方式

[0036] 下面结合附图来详细阐述本发明,但所述的实施例内容并不限制本发明。本实施例中的化学试剂,除非特别指明,均购自于Sigma-Aldrich Inc. (USA) .

[0037] 实施例1:氨基酸修饰 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的制备及表征

[0038] 在本实施例中,氨基酸修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的合成采用的是水热法。具体如下:将3g $FeCl_3$ 加入80mL乙二醇中混匀,充分溶解后,加入6g无水醋酸钠,0.1g丙氨酸或者组氨酸,充分混合30分钟,然后将样品放入反应釜中,200℃反应14个小时。冷却后,磁分离,乙醇清洗后,60℃烘干,分装保存。此方法合成的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒表面为丙氨酸或者组氨酸修饰,分别记为Ala- Fe_3O_4 ,His- Fe_3O_4 。其中未修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒记为Naked- Fe_3O_4 。

[0039] 经氨基酸修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒颗粒及未修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒纳米颗粒的表征是利用透射电子显微镜TEM (JEOL 2000FX 200kV),扫描隧道显微SEM (SEM,Hitachi S-4800) 拍摄。氨基酸修饰 Fe_3O_4 纳米酶颗粒表面咪唑环使用X射线光电子能谱学XPS (ESCALab220i-XL) 表征。

[0040] 结果见图1,氨基酸的修饰对 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的尺寸没有任何影响。而且不同氨基酸修饰的尺寸也是相同的。XPS表征表征组氨酸修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒表面具有N1官能团(咪唑环)。

[0041] 实施例2组氨酸修饰对 Fe_3O_4 纳米酶颗粒活性的影响

[0042] 0.2 μ g不同氨基酸修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒及裸的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒加入100 μ L反应液(0.2M醋酸钠,pH 4.5)中。然后加入终浓度为0.1M的 H_2O_2 及0.8mM的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),酶标仪iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad,USA) 测量652nm的吸光值。

[0043] 结果如图2A所示,组氨酸修饰可以显著性的提高 Fe_3O_4 纳米酶颗粒的过氧化物酶活性。

[0044] 实施例3组氨酸修饰对 Fe_3O_4 纳米酶颗粒对底物 H_2O_2 的亲合力及反应动力学的影响

[0045] Fe_3O_4 纳米酶颗粒及HRP对底物 H_2O_2 的反应动力学按照如下方案进行:

[0046] 不同修饰的 Fe_3O_4 纳米酶颗粒0.2 μ g或者0.1ng HRP加入100 μ L反应液(0.2M醋酸钠,

pH 4.5) 中。加入0.8mM的TMB以及梯度变化的H₂O₂,然后利用iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad,USA)对整个反应体系进行实施检测,绘制反应曲线,根据米氏反应方程 $v = V_{\max} \times [S] / (K_M + [S])$ 计算米氏反应常数。其中V_{max}为最大反应速度;[S]为加入酶的摩尔浓度;K_M为米氏反应常数;K_{cat}值得计算按照方程 $K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]$ 计算得到。

[0047] 绘制的米氏反应方程曲线如图2B所示,组氨酸修饰可以显著性的提高Fe₃O₄纳米酶颗粒的反应速度。详细计算得到的米氏反应动力学参数如表1所示。组氨酸修饰可以显著性的提高Fe₃O₄纳米酶颗粒对底物H₂O₂的亲合力。与Naked的Fe₃O₄纳米酶颗粒相比,组氨酸修饰可以将纳米酶颗粒对H₂O₂的亲合力(K_M)提高12倍,将催化效率(K_{cat}/K_M)提高21倍。因此,经过组氨酸修饰,Fe₃O₄纳米酶颗粒的米氏反应常数得到极大的改善。

[0048] 针对Fe₃O₄纳米酶颗粒来说,目前主要局限在于对H₂O₂的亲合力太低,本发明通过模拟天然酶活性中心,通过单个氨基酸的修饰,实现了对Fe₃O₄纳米酶颗粒对底物亲和力的极大改善,为纳米酶颗粒的优化提供了一个新的思路和新的方法。

[0049] 表1 Fe₃O₄纳米酶颗粒对底物H₂O₂反应动力学参数

Michaelis-Menten	Naked-Fe ₃ O ₄	Ala-Fe ₃ O ₄	His-Fe ₃ O ₄	HRP enzyme
[E] (M)	9.8×10^{-25}	9.8×10^{-25}	9.8×10^{-25}	2.3×10^{-23}
V _{max} (nM/s)	3.06	4.45	5.38	0.689
K _M (mM)	458.9	226.6	37.99	10.35
K _{cat} (s ⁻¹)	3.12×10^8	4.54×10^8	5.39×10^8	2.9×10^8
K _{cat} /K _M (s ⁻¹ M ⁻¹)	0.68×10^6	2×10^6	1.42×10^7	3×10^8

[0051] 实施例4组胺修饰对Fe₃O₄纳米酶颗粒对底物H₂O₂的亲合力及反应动力学的影响

[0052] 在本实施例中,组胺修饰的Fe₃O₄纳米酶颗粒的合成采用的是水热法。具体如下:将3g FeCl₃加入80mL乙二醇中混匀,充分溶解后,加入6g无水醋酸钠,0.1g组胺,充分混合30分钟,然后将样品放入反应釜中,200℃反应14个小时。冷却后,磁分离,乙醇清洗后,60℃烘干,分装保存。此方法合成的Fe₃O₄纳米酶颗粒表面为丙氨酸或者组氨酸修饰,分别记为Histamine-Fe₃O₄。其中未修饰的Fe₃O₄纳米酶颗粒记为Naked-Fe₃O₄。

[0053] 0.2μg组胺修饰的Fe₃O₄纳米酶颗粒及裸的Fe₃O₄纳米酶颗粒加入100μL反应液(0.2M醋酸钠,pH 4.5)中。然后加入终浓度为0.1M的H₂O₂及0.8mM的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),酶标仪iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad,USA)测量652nm的吸光值。

[0054] 结果如图3所示,组氨酸修饰可以显著性的提高Fe₃O₄纳米酶颗粒的过氧化物酶活性。

[0055] 参考文献

[0056] 1.L.Gao,J.Zhuang,L.Nie,J.Zhang,Y.Zhang,N.Gu,T.Wang,J.Feng,D.Yang,S.Perrett and X.Yan,Nat Nanotechnol,2007,2,577-583.

[0057] 2.L.Gao and X.Yan,Science China.Life sciences,2016,DOI:10.1007/s11427-016-5044-3.

[0058] 3.H.Weil and E.Wang,Chem Soc Rev,2013,42,6060-6093.

[0059] 4.X.Y.Wang,Y.H.Hu and H.Weil,Inorg Chem Front,2016,3,41-60.

[0060] 5.K.Fan,C.Cao,Y.Pan,D.Lu,D.Yang,J.Feng,L.Song,M.Liang and X.Yan,

Nature nanotechnology,2012,7,459-464.

[0061] 6.L.Gao and X.Yan,Pogress in Biochemistry and Biophysics,2013,40,892-902.

[0062] 7.L.Gao,Y.Liu,D.Kim,Y.Li,G.Hwang,P.C.Naha,D.P.Cormode and H.Koo,Biomaterials,2016,101,272-284.

[0063] 8.S.Takami,T.Sato,T.Mousavand,S.Ohara,M.Umetzu and T.Adschiri,Mater Lett,2007,61,4769-4772.

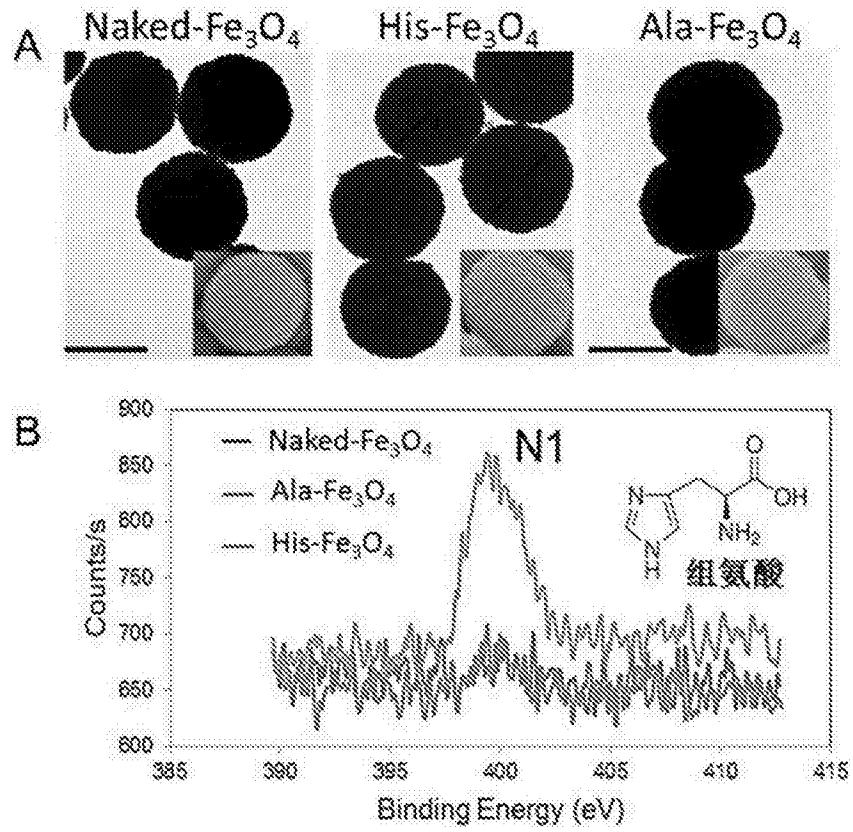


图1

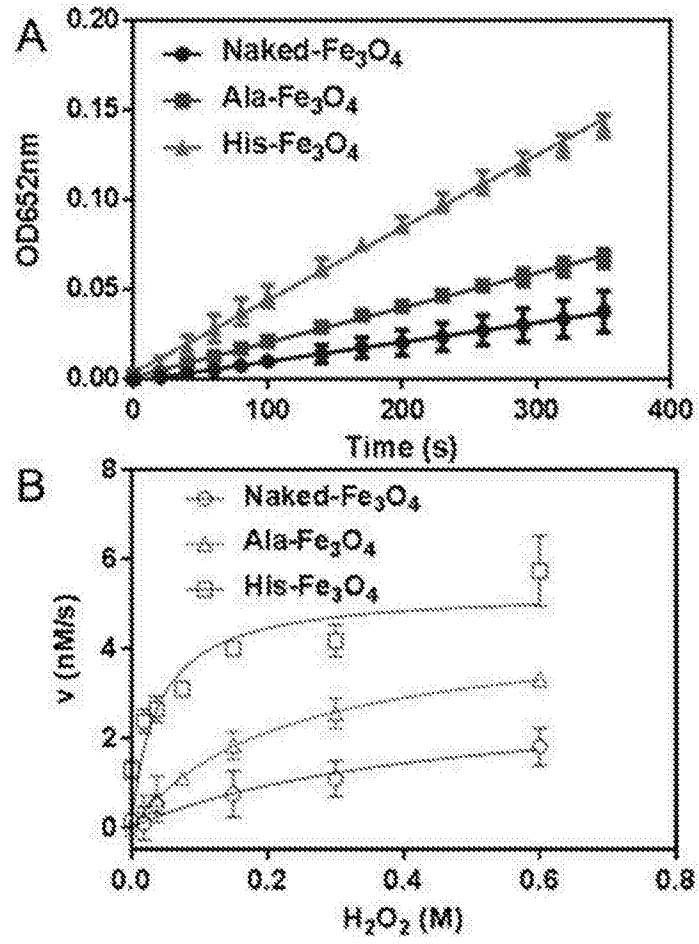


图2

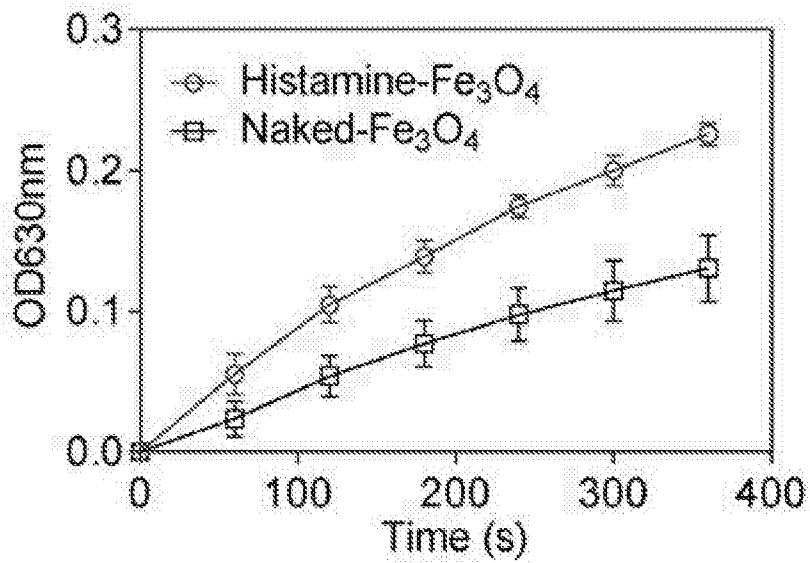


图3