符号说明

SWNTs	单壁碳纳米管
MWNTs	多壁碳纳米管
f-MWNTs	表面功能化修饰多壁碳纳米管
BSA	牛血清白蛋白
СА	碳酸酐酶
HG	牛血红蛋白
нк	己糖激酶
Ov	卵清蛋白
СТ	糜蛋白酶
CD	圆二色谱

,

.

.

原创性声明

本人郑重声明:所呈交的学位论文,是本人在导师的 指导下,独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引 用的内容外,本论文不包含任何其他个人或集体已经发表 或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人 和集体,均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任 由本人承担。

论文作者签名: 护风寒 日期: 2008.612

关于学位论文使用授权的声明

本人同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论 文的印刷件和电子版,允许论文被查阅和借阅;本人授权 山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关 数据库进行检索,可以采用影印、缩印或其他复制手段保 存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名: 孙泉 导师签名: 永上日期: 2008.5.25

中文摘要

本课题主要应用荧光、圆二色等光谱学方法研究了表面功能化 多壁碳纳米管(f-MWNTs)与多种蛋白质的相互作用,探讨了影响其 相互作用的影响因素,并从与蛋白结合能力以及对酶活性抑制能力 上对表面功能化多壁碳纳米管库进行生物分子水平上的筛选。

本研究主要包括以下两个方面内容:

第一部分通过稳态荧光光谱、时间分辨荧光光谱、圆二色光谱 对 f-MWNTs 与蛋白质之间的相互作用进行分析。 表面化学修饰 后的 f-MWNTs 分别带有羧基、酪氨酸、异丁胺等基团; 生物分子 包括 BSA 等 5 种蛋白质。通过将不同浓度的 f-MWNTs 加入蛋白质 溶液,然后分析蛋白质自身荧光的猝灭程度、荧光寿命变化以及蛋 白质二级构象变化。结合蛋白质自身物理性质和碳管表面化学性 质,对蛋白质与 f-MWNTs 的相互作用进行了综合分析,得到以下 结论:

 利用 Stern-Volmer 曲线对蛋白质自身荧光猝灭进行分析,加入 f-MWNTs 后蛋白质的荧光猝灭属于静态猝灭,因此蛋白质与 f-MWNTs 的结合是生成了稳定的蛋白质-MWNTs 复合物;

2. 静电吸附在蛋白质与 f-MWNTs 的相互作用中起着至关重要的作用。通过化学修饰,碳纳米管的表面电荷密度发生了改变,从而导致不同表面修饰的碳管与蛋白质相互作用的差异性;

 体积大的蛋白与 f-MWNTs 的结合能力更强。体积大的蛋白 质分子有较大的表面积和较多的氨基酸残基,为与 f-MWNTs 结合 提供了更多的空间;

4. 直径大的 f-MWNTs 能结合较多的蛋白质。直径较大的 f-MWNTs 具有更多的修饰基团,更容易与蛋白质结合。此外蛋白 质在碳管上会改变自身构象,使之与碳管的曲率相协调。

论文第二部分利用稳态荧光光谱,分别从与蛋白质的结合能力 和对糜蛋白酶活性抑制的角度对碳纳米管库进行了筛选。与蛋白结

合能力的筛选结果显示,大部分与各种蛋白质结合能力均较弱的 f-MWNTs都带有对氯苯酰氯基团;而对糜蛋白酶活性抑制的筛选 结果显示,大部分对该酶活性抑制较大的碳管均含有 N,N-二丁胺 基团。

综上所述,本论文从分子水平对 f-MWNTs 的生物效应进行了 体外研究,发现 f-MWNTs 与蛋白质的结合具有一定的选择性。蛋 白质在生命活动中是一种及其重要的大分子,蛋白质构象决定其生 理功能。因此,通过改变碳管尺寸、形状、表面电荷或者表面化学 基团可以调节其与蛋白质的结合能力,从而降低碳纳米管的生物毒 性、提高其生物适应性,确保碳纳米管在生物医药等领域中应用的 安全性。

关键词:表面功能化多壁碳纳米管;碳管-蛋白相互作用;光谱法; 组合化学;生物筛选

ABSTRACT

This research mainly focused on the interactions between surface functionalized multiwalled carbon nanotubes and proteins by studing influence factors of the complex formation using various spectroscopies. Then a carbon nanotube combinatorial library was screened with reduced protein binding and inhibited enzyme activity. It consists of the following two parts:

In the first part, using steady-state fluorescence, time-resolved fluorescence and circular dichroism (CD) spectroscopies the interactions between proteins and functionalized multiwalled carbon nanotubes (f-MWNTs) were analyzed. Besides the pristine MWNTs, we chose functionalized MWNTs (carboxyl, tyrosine and isobutyl amine), and five proteins including BSA, hemoglobin and so on for their interaction study. Adding f-MWNTs into protein solution induced quenching of the protein intrinsic fluorescence, and lead to a conformational change of proteins. Through comparison and analysis of surface chemistry of f-MWNTs, we make the following conclusions:

1. Using the Stern-Volmer plots to analyse the fluorescence quenching proteins and the results showed that f-MWNTs quenching effect on protein fluorescence belongs to the static quenching mechanism, therefore, there is the formation of binary complexes.

2. Electrostatic interaction plays a dominant role in protein binding on f-MWNTs. The charge density changing of f-MWNTs under the surface functionalization, thus causes the differences of the binding effect.

3. Larger proteins showed stronger binding with f-MWNTs, because there are more amino acid residues on a larger surface that might support a stronger binding.

4. f-MWNTs with larger diameter showed stronger protein bindings.

Larger surface with more functional groups made the binding easier. Moreover, smoother curvature can induce larger protein conformational changes while the protein adapts to the "unfamiliar" surface curvature in one dimensional nanoparticles.

For the second part, by sreening the f-MWNTs library on the affinity of protein binding; it was found that acylator AC005 produced much less protein binding. Then, by screening the f-MWNTs library on the inhibition of enzyme activity we found that amide AM002 inhibited enzyme activity most.

As a whole, this paper studies the bioeffect of f-MWNTs on a molecular level, and proves that protein/f-MWNTs binding is selectively. Protein is important in vital movement and its conformational structure determines it vital function. Therefore, by modulating the size, shape, surface charges, or surface chemistry of MWNTs, the protein-binding capability and their in-vivo toxicity can be regulated, biocompatibility be improved, and potential application in nanomedicine be optimized.

Keywords: Surface Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes; Protein/f-MWNTs interaction; spectroscopy; Combinational Chemistry; biological screening

第一章 前 言

1.1 引言

纳米材料是指三维结构中至少有一维大小在纳米尺度上的材料。纳米(nm)即十亿分之一米,纳米尺度通常定义为从 100nm 到原 子大小(约 0.2nm)。材料特性在纳米尺度上与大尺度时有很大的不 同。纳米材料具有较大的比表面积,能使它的化学反应更容易进行 并能影响它的力学和电特性;量子效应在纳米尺度上开始对物质的 性质起支配作用,将影响其光、电和磁性质。这些特性使纳米材料 在计量学、电学、光学以及信息通讯等方面有着广泛的应用。近期 研究发现纳米技术在生物、医药上也具有巨大的应用潜力,包括疾 病诊断、药物靶向传输、分子成像、生物传感器等^[1-10]。

随着纳米材料越来越多地用于人类的日常生活中,其潜在毒性 越来越为人们所关注[11-16]。碳纳米管和其它纳米管的物理特征意味 着它们可能有类似石棉纤维的毒性,所以对其毒理进行深入研究是 纳米管被广泛应用的前提。如果纳米颗粒穿透皮肤,他们可能促进 导致细胞损伤的反应分子产生。尽管目前尚无充分的证据表明用于 化妆品的其它纳米粒子是否能穿透皮肤,但实际上这些原料的安全 性已被企业界科研机构所研究,只是其结果作为商业秘密并没有公 开在科学文献中。目前,有关纳米粒子对其它非人物种影响(如它 们在水中和土壤中的特性及它们在食物链中的积累能力等)的研究 报道较少。有报道发现细胞暴露于碳纳米管后,可以导致抗氧化物 的枯竭以及细胞活力的丧失,也可能发生超微结构和形态学的变化 ^[17-23]。然而目前纳米材料对细胞和动物的毒性及与蛋白质、DNA等 生物大分子的相互作用尚缺乏有价值的研究结果。英国皇家学会和 英国皇家工程学院于 2006 年 10 月 24 日发布了一个新的报告, 对英 国政府迟迟不能确定纳米材料对人体健康和环境是否有潜在影响, 表示严重担忧^[24]。2006 年 2 月 Science 发表了题为" Toxic Potential of Materials at the Nano Level"的文章,论述了纳米尺度材料的潜在毒

性及其可能的机制^[25]。美国"纳米新产品项目"机构的首席科学顾 问安德鲁·梅纳德联合其他 13 名科学家在 2006 年 11 月 Nature 杂志 上发表了题为"Safe Handling of Nanotechnology"的文章,指出由 于对纳米技术的风险性缺乏清晰的认识,社会团体正处于浪费巨大 的纳米技术潜能的危险之中^[26]。一年后的 2007 年 11 月 Scheufele 等 在 Nature Nanotechnology 上再次发表评论,强调必须研究"Pollution and New Health Problems as a Result of Nanotechnology"^[27]。因此, 上述研究领域是当前国际学术界关注的焦点问题之一,已公开报道 的研究结果还没有明确的结论,有些结果甚至相互矛盾。因此,这 些研究领域的空白将会大大制约纳米材料的应用前景。

纳米材料的生物活性从根本上来说是纳米粒子与一系列生物分 子相互作用的过程。蛋白质是一类极为重要的生物大分子,蛋白质 的结构决定其功能。研究表明,纳米材料进入生物体后,进入不同 组织与细胞,进而与多种蛋白质发生相互作用,纳米材料巨大的比 表面积、表面电荷以及功能化修饰的活性基团使其特异性或非特异 性的吸附或结合体内多种蛋白质,从而影响蛋白质的结构和功能, 比如蛋白质的变性、信号传导通路的激活、抗体结合等生理效应^[28]。 因此研究碳纳米管与体内重要蛋白质,尤其是血液中蛋白的相互作 用对研究纳米材料的生物效应以及开发纳米材料的潜在应用,将是 至关重要的。

1.2 碳纳米管简介

碳纳米管是 1991 年日本科学家 Sumio Iijima 发现的一种针状的 管形碳单质,又名巴基管,是继富勒烯之后出现的又一种新型碳质 纳米材料。透射电镜和扫描电镜对的研究结果表明碳纳米管从结构 上可视为由石墨片卷曲而成的中空管状结构,其管壁是一种类似于 石墨片的碳六边形网状结构,直径在几个纳米到几十纳米之间,长 度却可达几十甚至上百微米,长径比很大。碳纳米管根据管壁上碳 原子层数的不同分为单壁碳纳米管和多壁碳纳米管。单壁碳纳米管

是由一层碳原子构成的纳米管,多壁碳纳米管则是由几个到几十个 单壁同轴卷曲构成,管间距为 0.34nm^[29]。

与传统碳质材料相比,碳纳米管具有一些独特的性质,如特殊 的导电性能、力学等物理化学性质^[30],因此碳纳米管自出现以来即 引起关注并广泛应用于诸多科学领域。例如根据碳纳米管独特的一 维管状结构和极大的长径比可将其制成高效的传质单元;超薄的针 形尖端使碳纳米管可用做扫描隧道显微镜及原子力显微镜的探针; 碳纳米管具有较强的场发射性能,是一种优良的场效应晶体管材料。 Duan^[31]等最近在研究中发现,用金属铯对单壁碳纳米管进行修饰能 加强场发射性能;碳纳米管兼具金属或半导体导电性,是一种理想 的电极材料。Sotiropoulou^[32]等将在铂电极表面生长的直线型多壁碳 纳米管进行氧化处理,在碳纳米管开口端引入了羧基并能够有效地 固定葡萄糖酶,为信号控制提供了优良的传导平台;碳纳米管的比 表面积较大,可应用于储氢、储能以及吸附剂等领域。

碳纳米管具有生物亲和性,可以和人体的组织器官形成友好的 界面;由于生物分子如蛋白质或酶可以固定在碳纳米管的表面或空 穴中,基于碳纳米管的纳米尺度生物传感器和生物反应器系统成为 研究的热点。随着各种修饰生物分子的纳米装置的研制成功,碳纳 米管做为一种高级生物传感器材料已经进入应用领域,在抗原识别、 酶催化反应和 DNA 杂交有潜在的利用前景^[33-38];在生物医学上,碳 纳米管可以作为人工肌肉的电动机械制动器,用生物活性分子对碳 纳米管进行功能化后,碳纳米管可以作为神经生长的基质^[39];碳纳 米管可以作为多功能生物传输器、药物载体和选择性杀伤癌细胞的 近红外媒介^[40]。

1.3 碳纳米管与蛋白质相互作用的研究进展

1.3.1 蛋白质在碳纳米管上的吸附

蛋白质有一种自发而且不可逆地吸附到固体表面的倾向。有些 情况下,蛋白质的这种吸附是有害的,例如各种蛋白质污染过程。

而有些情况下,蛋白质在固体表面的吸附是一种期望得到的过程, 例如各种生物传感器的应用。

近期研究发现蛋白质、糖酶、核酸等生物分子可以结合到碳纳 米管上,使碳纳米管的生物学应用得到广泛关注。许多蛋白质分子 可以自发地吸附到碳纳米管表面,或通过功能化反应以可控的方式 固定在碳纳米管表面^[41]。有报道发现许多蛋白可以通过非特异性吸 附牢固地结合到多壁碳纳米管的外表面,当多壁碳纳米管的底端被 氧化打开,小的蛋白质分子就可以进入管道中。用这种方式固定在 多壁碳纳米管上的酶可以保持正常的生物活性^[34,35]。Balavoine^[42] 等研究者发现链亲合素和氢化酶调节基因可以吸附在多壁碳纳米管 表面形成螺旋结晶结构,导致蛋白质在碳纳米管表面有序排列。 Boussaad^[43]等人通过监测单壁碳纳米管的导电性变化发现细胞色素 c可以非特异性的吸附在半导体单壁碳纳米管上。Dai^[44]实验室的研 究者报道在TEM 网栅中直接将化学气相沉积法生产的单壁碳纳米管 在铁蛋白水溶液中孵育,并没有发现蛋白吸附现象。而 Azamian^[45] 和 Lin 等人却发现在水溶液中铁蛋白能够牢固地吸附在单壁碳纳米 管上,并使单壁碳纳米管在水中的溶解性增加。

1.3.2 碳纳米管与蛋白质相互作用的机理研究

在各种情况下,对蛋白吸附机理的了解是得到最优化条件的首要因素^[33]。从反应机制上说,蛋白质在碳纳米管上的非特异性吸附 比普遍认为的疏水作用要复杂^[46]。例如 Shim^[47]等人发现链亲合素很 容易吸附到单壁碳纳米管上,但是纤维蛋白原却不易吸附,这与疏 水作用原理相背离,因为相对于链亲合素来说,纤维蛋白原与疏水 界面有很强的亲和性。蛋白与介质表面的非特异性吸附还包括静电 作用、氢键作用等级制^[48]。但是,Azamian^[49]等人发现蛋白在碳纳 米管上的吸附与蛋白的等电点无关,无论带正电荷的蛋白还是带负 电荷的蛋白都在碳纳米管上有很强的吸附,因此与静电作用机制不 相符合。至于有些研究所观测到的蛋白吸附,很可能是与碳纳米管

的氨基亲和作用有关,至少是部分相关,因为蛋白质通常含有足够 多的表面氨基。Dhriti^[50]等人的研究证明在 pH 值低于溶菌酶的等电 点时,除了 π-π 作用和疏水作用外,溶菌酶还通过质子化的氨基成分 与单壁碳纳米管的缺陷位点相互作用。在 pH 值高于蛋白等电点时, 它们之间的相互作用表现为氨基在碳纳米管上的吸附。Carolina^[51] 等研究发现血清和血浆蛋白在碳纳米管上的结合具有高度的选择 性,除血清补体蛋白、纤维蛋白原和阿朴脂蛋白 AII、AIV 和 CIII 外,其它的蛋白几乎不会结合到碳纳米管上。Meng^[52]等人发现表面 无纺化的单壁碳纳米管能够选择性地吸附纤维蛋白原,而对白蛋白 的吸附能力很弱。吸附在碳纳米管上的纤维蛋白原发生了构象的变 化,而且其介导血小板识别、粘附、活化和聚集的功能受到严重的 影响。

缩氨酸和碳纳米管的相互作用可以作为蛋白质和碳纳米管相互 作用的一个模型,其结果具有一定的参考意义。Wang^[53]等人开发了 一种抗菌素显示技术用来确定不同肽序列与碳纳米管非共价反应的 亲和力是否具有选择性。他们发现组氨酸单元(H),特别是色氨酸单 元(W),对缩氨酸与碳纳米管表面的相互作用有重要的贡献,这些氨 基酸残基中的芳香环结构提供了缩氨酸与碳纳米管之间相互作用的 亲和力。另外,他们还发现两性缩氨酸和在溶液中较易变形的缩氨 酸序列更易于与碳纳米管结合。

1.3.3 碳纳米管对蛋白质结构和功能的影响

蛋白质分子具有一条或数条多肤链,在三维空间有一定的走向与 排布,它是由二十多种氨基酸通过肽键共价连接而成。蛋白质分子 的构象又称为空间结构、立体结构、高级结构等。所有这些是指蛋 白质分子中所有原子在三维空间的排布。蛋白质的结构具有不同的 结构层次:包括一级结构、二级结构、超二级结构、结构域、三级结 构和四级结构。蛋白质在体内执行的多种生物学功能如酶的催化, 运载和储存,免疫保护等等的实质是专一的结合和构象变化的传递

[54]

已经有报道显示碳纳米管与蛋白质相互作用时会导致蛋白质二 级结构发生不同程度的变化^[55]。Dordick^[56]等研究了a-胰凝乳蛋白酶 和大豆过氧化物酶吸附在单壁碳纳米管(SWNTs)上后,蛋白构象和 酶活性的变化。其中大豆过氧化物酶较好的保持了天然结构;而a-胰凝乳蛋白酶二级结构发生了较大的变化,肽链展开吸附在SWNTs 表面。这些构象上的变化直接导致a-胰凝乳蛋白酶的酶活力几乎完全 丧失,而大豆过氧化物酶则保持了30%的酶活力。Matsuura^[57]等人研 究了SWNTs在蛋白溶解酵素(LYS)和BSA水溶液中的分散性,发现 LYS和BSA结合在SWNTs表面,在疏水作用下,蛋白质的疏水基团由 于蛋白三维结构的变化而暴露于溶剂中,从而使蛋白质发生变性。 同时研究证明蛋白质的组成单元氨基酸与SWNTs作用也同样具有构 象选择性^[58],在相互作用时,氨基酸分子调节自身构象,使芳香环 易于和SWNTs相结合^[59,60]。

1.3.4 研究蛋白质结构的方法

1.3.4.1 X 射线单晶衍射分析

X射线单晶衍射分析迄今仍然是蛋白质结构测定的主要方法。正 是由于这种技术的应用促进了分子生物学的建立和发展。现在的X射 线晶体结构分析正努力在第四维时间坐标上跟踪、分辨和描述大分 子的结构变化,即所谓的四维结构测定。尽管蛋白质的X射线结构图 能够在原子水平上提供详细的信息,但仍然面临很多困难,其中最 困难的一步就是获得好的晶体。由于对蛋白质单晶生长缺乏内在的 规律性的认识,使单晶培养具有很大的不确定性。并且,绝大多数 生物大分子至今无法得到单晶,X射线衍射法就显得无能为力了。另 外,这种技术所提供的主要还是静态图,因此无法对蛋白质之间的 相互作用、电子传递过程、动力学等方面进行研究^[61],也不能阐明 在生理状态下蛋白质结构与功能的关系。

1.3.4.2 圆二色谱法

1953年第一台偏振光检测仪问世。1969年,Greinfield最早用圆 二色光谱数据估计了蛋白质的构象^[62]。经过不断发展,圆二色(CD) 已经成为一种比较成熟的测定溶液中各种生物大分子构象的方法。 当化合物的生色团处在不对称环境中与极化光相互作用时就会产生 圆二色现象。一般的蛋白质的圆二色光谱分为远紫外区(185-245nm) 和近紫外区(245-320nm)^[63]。远紫外区是肽键的吸收峰范围,通常许 多蛋白质二级结构构象如α-螺旋、β-折叠、反平行β-折叠、β-转角以 及L-多聚脯氨酸(P2),在此区域都有自己独特的CD谱。α-螺旋在2222 nm和208 nm有较大的负的CD谱,对应着n,π*跃迁,羰基氧的未成键 电子被激发跃迁到反键轨道,在193nm有正的CD谱,对应于π,π*跃 迁,具有高消光系数,π电子在整个肽段上发生离域。在α-螺旋结构 中,肽生色团彼此相互作用,由于这种相互作用,π,π*跃迁被裂分 成两个带,信号变化在200nm左右,这是明显的激子裂分的例子。

除此之外,一些特殊的二级结构构象,如在胶原质中发现的左 旋P2构象,经常在一些球蛋白的短片段中出现^[64]。近紫外区主要与 芳基氨基酸侧链有关。二硫键一般不对称,它在250-260nm内有一个 峰。苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸三种侧链的峰在250-290nm的区间内, 这些残基的不对称性决定于它们所处的微环境特性。若二硫键的CD 峰贡献过强,二硫键与三种氨基酸残基侧链的峰会发生重叠现象, 以至于无法分辨。蛋白质主链的三级结构处在不对称环境中在此区 域也会有较强的CD谱,可以作为描述蛋白质特征的指纹区^[65]。另外, 非蛋白质成分辅因子如四羟酮醇在这一区域也会有吸收。尽管将这 一区域内各种产生CD峰的各种生色团完全区分开非常困难,但对近 紫外区的分析仍受很大重视,因为这一区域能够非常灵敏地反映各 种构象的细微变化。

1.3.4.3 紫外可见光谱法

紫外可见光谱法是各种光谱法的基础,它是测定物质对紫外、

可见区波长的选择性吸收而产生的吸收光谱,并借助于吸收光谱对 被侧物质进行定性定量分析。蛋白质的结构单元是α-氨基酸,常见的 20种α-氨基酸中只有芳香族氨基酸,如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和 含硫氨基酸,在230-310nm波长范围内有吸收,因此利用紫外光谱法 可以考察芳香族氨基酸的残基在蛋白质分子中的位置(即表面和内 部)、环境及数量,以及在物理和化学因素影响下蛋白质二、三级结 构的变化。蛋白质的紫外吸收光谱中,一般210nm处的峰是肽键的强 吸收峰,280nm处的峰是酪氨酸、色氨酸以及苯丙氨酸残基中共扼双 键的吸收峰。生色团有各种微环境,当微环境发生变化时,如电荷 变化,基团发生解离、形成氢键,溶剂极性发生变化等,吸收光谱 随之发生变化:吸收峰红移或蓝移,吸光度及谱带半宽度也有变化。 因此,根据生色基团吸收光谱的变化,可以了解微环境的变化,进 而推断蛋白质在溶液中的构象。结合可见区和近紫外区CD光谱的变 化,即可确认发生变化的基团^[66]。

1.3.4.4 荧光光谱

荧光分析法具有灵敏度高、选择性强、用量少、方法简便以及 能提供较多的物理参数等特点,这些参数从各个角度反映了蛋白质 分子的成键和结构情况。当分子处于单重激发态的最低振动能级时, 去活化过程的一种形式是以10⁻⁹-10⁻⁶秒左右的短时间内发射一个光 子返回基态,这一过程称为荧光发射。

在蛋白质分子中,能发射荧光的氨基酸残基有色氨酸、酪氨酸 和苯丙氨酸,个别蛋白质分子含有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)也能发 射荧光。三种氨基酸由于侧链生色基团的不同而有不同的荧光激发 和发射光谱。其中色氨酸的荧光强度最大,酪氨酸次之,苯丙氨酸 最小。因为蛋白质的荧光通常在280nm或更长的波长被激发,苯丙氨 酸在绝大多数实验条件下不被激发,所以很少能观察到其荧光发射, 这样蛋白质的内部荧光主要来自色氨酸与酪氨酸两种残基。色氨酸 残基对微环境的变化很敏感,并且大多数蛋白都含有几个不同的色

氨酸残基,因而常作为内源性荧光探针来研究溶液状态下蛋白质的 构象。除测定蛋白质分子的自身荧光,即"内源性荧光"外,还可 以利用荧光探针,即"外源性荧光"。荧光探针有两种:稀土离子 荧光探针如铕(III),铽(III),有机荧光探针如1-苯胺基萘-5-磺酸(1, 8-ANS)、1-N, N-二甲胺基萘-5-氯磺酸(1,5-DNS-C10)和2-对甲胺萘-6-磺酸(2,6-TNS)等。

在已研究的许多蛋白质中,球蛋白是研究得比较多的一种蛋白, 根据其荧光性质不同,又可分为A类球蛋白和B类球蛋白^[67]。A类蛋 白能发射酪氨酸残基的特征荧光光谱,且酪氨酸荧光光谱的位置不 受蛋白质构象变化的影响。B类蛋白,由于其分子中从酪氨酸残基到 色氨酸残基之间发生了能量转移,从而导致酪氨酸残基的荧光猝灭 和色氨酸残基的荧光增强。因此B类蛋白的荧光实际上是色氨酸的荧 光峰,而色氨酸残基的荧光光谱对微环境的变化很敏感,其峰位一 般在325-350nm波长之间变动。

在传统的荧光分光光谱技术的基础上,上个世纪七十年代出现 了同步荧光技术,即同时扫描激发和发射波长的情况下来测量荧光 光谱图,由测得的荧光强度信号对发射或激发波长作图,它包括固 定波长的同步荧光和固定能量的同步荧光两种。固定波长的同步荧 光首先由Lloyd提出^[68]固定能量的同步荧光随后由Inman等人提出 ^[69]。1979年,Miller用此技术分别获得了色氨酸和酪氨酸的特征光谱。

1.3.4.5 红外光谱法

红外光谱谱图解析主要是在掌握影响振动频率的因素及各类化 合物的红外特征吸收谱带的基础上,按峰区分析,指出某谱带可能 属于哪个峰区,结合其它峰区的相关峰,确定其归属。在此基础上, 再仔细归属指纹区的有关谱带,综合分析,提出化合物的可能结构。 与其它谱比较,红外光谱谱图的解析更具有经验性、灵活性。

蛋白质和多肽在红外区表现为9个特征振动模式或基团频率 ^[70](表1.1)。

名称	波数/cm ⁻¹	振动模式		
		N-H 伸缩振动		
酰胺A	3300	酰胺带的一次泛频,费米共振		
酰胺B	3100	C=O伸缩振动		
酰胺I	1660	N-H面内弯曲振动和 C-N 伸缩		
酰胺Ⅱ	1570	振动		
酰胺Ⅲ	1300	C-N伸缩振动和 N-H 面内弯曲		
		振动		
酰胺IV	630	O≔C-N面内弯曲振动		
酰胺V	730	N-H 面外弯曲振动		
酰胺Ⅵ	600	C=O面外弯曲振动		

表1.1.蛋白质酰胺基团的特征振动频率和振动模式

其中最常用于二级结构分析的是酰胺I带,位于1700-1600cm⁻¹范 围。酰胺I带的振动频率取决于C=O和N-H之间的氢键性质,即特征 振动频率反映了蛋白质特定的二级结构。傅立叶红外光谱(FTIR)具有 高的光谱灵敏度,重现性好,分辨率高的特点。这些特点可以使得 傅立叶去卷积和二阶导数或四阶导数的分析用于红外光谱,可以用 于蛋白质二级结构的指认。

表面增强红外光谱的出现使得生物分子的检测可达到单层水 平,近期,Heberle^[71]等人根据X-射线衍射结果又将酰胺I带的峰重 新进行了归属,特别指出1693 cm⁻¹的峰应归属为β-转角类型III。

1.3.4.6 拉曼光谱法

拉曼光谱与红外光谱是相互补充的。在拉曼光谱中, 谱带频率 与功能团之间的关系与红外光谱基本一致, 但是两者的选律不同。 在拉曼光谱中, 振动谱带的叠加效应较小, 谱带清晰, 对整个分子 的骨架振动的表示比较有特征性。另外, 拉曼光谱还可以测定分子 的退偏度比, 利于弄清分子的对称性等。与红外光谱相比, 拉曼光 谱没有水的影响,补充了红外光谱在生物大分子研究上的弱点。生物大分子中的烯键、炔键、硫桥键(550-430 cm⁻¹)、碳-碳键在红外光谱上是弱信号,而在拉曼光谱上的信号很强。而且拉曼效应对于分子构象的变化比较灵敏,生物大分子的结构是螺旋体或平面折叠型,因此偏振和退偏度的测定具有指导意义。并且拉曼光谱样品用量很少,可低至微克,这对生物化学体系也是非常重要的。由于这些特点,拉曼光谱被越来越广泛地应用于研究各种生物高分子的结构及它们在水溶液中受外界环境(温度、离子强度、pH等)的影响。酰胺键的九种振动模式及其拉曼频率如表1.2所示。

在这些谱带中, 酰胺I和III谱带在拉曼光谱为强谱带, 他们的强 度和位移对蛋白质的二级结构如α-螺旋、β-折叠、无规卷曲、γ-回转、 β-回转等是非常敏感的。α-螺旋的酰胺I谱带位于酰胺I区较低波数范 围, 在1645-1657cm⁻¹之间, 其酰胺III谱带则位于酰胺III区较高波数 范围, 在1264-1300cm⁻¹之间。β-折叠与α-螺不同, 其酰胺I谱带位于 较高频率范围, 通常在1658-1700cm⁻¹。酰胺III谱带则位于较低频率 范围, 在1230-1240cm⁻¹之间。无规卷曲的酸胺I谱带具有中等的频率 值, 在1660-1665cm⁻¹范围内, 酰胺III谱带与β-折叠的频率相似, 具 有较低的频率值, 在1240cm⁻¹附近。β-回转的酰胺谱带位置与其它三 种结构有所不同, 其频率值较分散。由于肽键(酰胺键)的环境是蛋白 质主链构象的反映。因此, 可以利用肽键的特征振动谱作为指标, 来推断蛋白质的主链构象^[72]。

山东大学硕士学位论文

名称	波数/cm ⁻¹	振动模式
酰胺 A	3300	N-H 伸缩
酰胺B	3100	N-H 伸缩,费米共振
酰胺I	1597-1680	C=O 伸缩,N-H 变形,C-N 伸缩
酰胺Ⅱ	1480-1575	C-N 伸缩, N-H 变形
酰胺Ⅲ	1229-1301	C-N 伸缩, N-H 变形
酰胺Ⅳ	625-767	O=C-N 变形
酰胺V	640-800	N-H 变形
酰胺VI	537-606	C=O 变形
酰胺Ⅷ	200	C-N 扭曲

表1.2.蛋白质酰胺键的九种振动模式及其拉曼频率

1.3.4.7 核磁共振法

40年代核磁共振被发现,50年代,开始应用核磁共振法(NMR) 研究溶液中的蛋白质构象,80年代获得重大突破。1986年,K.Wiithrich 等人用二维核磁共振法(2D-NMR)测定溶液中蛋白质分子构象,取得 了成功,从而开辟了一条测定溶液中蛋白质分子构象的新途径。到 目前为止,在测定蛋白质分子构象方面,2D-NMR法在精度上虽然还 不如X射线衍射法,但它有许多优点是X射线衍射法无法比拟的。如: X射线衍射法会破坏蛋白质分子的构象,而NMR法不会;X射线衍射 法只能测定晶体蛋白质的分子构象,而NMR法可以测定溶液中蛋白 质分子的构象;X射线衍射法只能测定蛋白质分子的静态构象或构象 变化的初始态和终止态,而NMR法能够测定蛋白质分子的构象变化 过程^[73]。

由于NMR法的非破坏性,用NMR法来研究完整组织受到广泛重视,可根据NMR谱图确定其成分的存在和浓度。NMR法可以研究溶液条件如pH、温度、离子强度等的改变对蛋白质分子空间构象的影响,观察蛋白质分子的变性过程与空间结构的关系,研究蛋白质分

子与蛋白质分子之间或蛋白质与核酸分子之间的相互作用。NMR技 术还可以研究蛋白质分子的构象动力学。但是,二维、多维核磁共 振技术仅能测出溶液状态下较小蛋白质的构象,可是对分子量较大 的蛋白质的计算处理非常复杂。

1.4 纳米材料的功能化修饰

1.4.1 纳米材料表面功能化对生物分子的作用

碳纳米管具有巨大的比表面积,许多有机(包括生物分子)或无 机分子可以共价或非共价地结合于碳纳米管的表面,对碳纳米管进 行表面修饰或功能化。功能化的碳纳米管可以获得原始未修饰碳管 所没有的性质,包括使碳纳米管在介质中的分散程度和溶解性得到 提高、阻止蛋白分子的非特异性吸附、能够识别和结合特定的生物 分子等。例如,Linhardt^[74]等通过在碳纳米管上固定肝磷脂。增加了 碳纳米管的生物适应性,使纳米碳管更好的与血液相兼容。Shim等^[47] 以表面活性剂Triton和聚乙二醇(PEG)对SWNTs进行修饰,可以有效 阻止抗生物素蛋白链霉素在碳管表面的非特异吸附;在此基础上, 以目标蛋白的配体对碳纳米管进行进一步的修饰,则可以实现碳纳 米管对目标蛋白的特异性结合。此外, 经亲水性PEG修饰的SWNTs, 可以在水溶液中与牛血清白蛋白(BSA)进行交换反应,形成SWNTs 与BSA的结合物,经全蛋白分析证明,附着于碳纳米管上的绝大部分 (86 ±2%) BSA仍然具有生物活性^[75];此外,以42hydroxynonenal (42HNE)功能化的MWNTs与42HNE的抗体也可以发生特异性结合 ^[76]。Rtello^[77]等研究人员在金纳米颗粒上修饰了多种带有荧光的聚 合物。当修饰后的金纳米粒子与蛋白相互作用时,荧光猝灭的差异 使金纳米粒子可以准确识别不同的蛋白质。此外他们还发现通过功 能化修饰的金纳米粒子对α-胰凝乳蛋白酶活性的抑制作用是可控的 [78]

1.4.2 组合化学的意义

组合化学,又称多重合成法,是一种大量而快捷的合成方法。它 是根据组合论的思想将各种化学构建单元以系统平行的方式进行反 应,可以在极短的时间内迅速获得大量的化合物。组合化学的本质是 一种快速大量的合成方法,它是种将分子设计、化学合成、组合理论 及分子识别融合为一体的技术。根据已有的分子构效知识,以某种药 物先导化合物为起始原料,采用组合化学方法快速地合成出大量衍 生物,从而为药物的筛选提供足够的候选化合物。按照组合化学原理, 将不同分子有计划、有规律、系统的合成出来的分子数量庞大的化 合物群即称为化合物库^[79-81]。

目前的药物开发已经进入了一个新时期,即新的受体和酶正在 不断地被证实为药物治疗的靶分子,但药物开发者却局限于筛选天 然产物的提取物或从化合物专利中寻找线索。由于组合化学能够快 速地合成出成千上万,具有结构多样性的化合物,因此组合化学能 够加快发现新的先导化合物。另外,在对先导化合物进行优化时, 组合化学也有其用武之地。组合化学在没有任何结合模型时通过平 行地合成大量化合物来达到优化先导化合物活性的目的。即使药物 化学家已经了解了先导化合物的作用方式,组合化学仍然有助于加 速对构效关系的探讨。传统与平行的先导化合物类似物合成和筛选 的比较组合化学技术已用来在希望寻找以前未知的先导化合物方面 来制备大量化合物。由于有了先导化合物,合成较小的和较少多样。 性的化合物就可以达到优化先导结构的效果。在这两种应用中,后 一种方法更可能成功,因为化合物库中化合物的设计是围绕着有高 效生物活性的先导化合物进行的,而不是用亲和的方法从一类以前 未探索过的受体或酶中寻找一个有效的化合物。目前已报道的成功 例子是建立在一些众所周知的结构上的那些化合物。组合化学及其 相关技术对药物开发产生了极大的影响,未来一段时间内的药物开 发将极大地得益于组合化学。

1.5 展望

从以上的文献综述中可以明显地看出,蛋白和碳纳米管之间在 分子水平上的相互作用还需要更加深入的研究。例如,蛋白质分子 的不同氨基酸残基成分和序列以及二级结构(或者三级结构和四级 结构)可能会给这种非特异性反应和相关特性带来重要的影响。碳 纳米管电子结构和表面功能化基团在这种相互作用中所起到的作用 也需要分子水平上的研究。

把组合化学概念引入到碳纳米管的功能化修饰上,可以修改碳 纳米管的表面性质,降低碳纳米管的生物毒性,加快了碳纳米管在 生物适用性潜力上的开发速度。有理由相信,组合技术应用于纳米材 料修饰将会使许多相关学科尤其是化学、生物学勃发出新的生机。

第二章 功能化多壁碳纳米管与蛋白质相互作用的影 响因素探讨

2.1 引言

纳米材料的结构、尺寸、表面化学性质、电荷和形状是影响纳 米材料生物活性的重要参数。近年来尽管有越来越多针对单壁碳纳 米管(SWNTs)与蛋白质相互作用研究的文献发表,但是对于多壁碳 纳米管(MWNTs)与蛋白质相互作用的研究领域还是一个空白。当 SWNTs 与氨基酸和蛋白质相互作用的时候,会发生选择性的结合 ^[53,58,60],疏水作用、π-π作用、静电吸引都起了非常重要的作用。 蛋白质构象的变化和蛋白质的变性都可以证明 SWNTs 与蛋白质的 这种相互结合,并且蛋白质内部的疏水区域更趋向于和 SWNTs 结 合。

本章主要探讨了不同直径的 MWNTs 通过表面功能化修饰,在 改变其表面的疏水性质、静电性质和空间位阻的情况下与蛋白质的 相互作用,所选择的几种蛋白质具有不同的生物学功能和表面性 质。研究证明蛋白质与功能化修饰的碳纳米管 f-MWNTs 之间的相 互作用不仅与纳米材料的大小(直径)有关,同时还与蛋白质和 f-MWNTs 的表面性质有关。此外,我们还发现实验中随着羧基化 碳纳米管的进一步功能化而得到的几种 f-MWNTs 与蛋白质的亲和 能力也会有不同程度的减弱。这些发现显示,通过对 MWNTs 的表 面化学修饰可以有效地增加其生物相容性或者降低其对生物体的 毒性,为确保碳纳米管在生物医药领域更为安全可靠的应用打下工 作基础。

2.2 实验材料和方法

2.2.1 实验仪器和试剂

实验试剂:

牛血清白蛋白(BSA)购自 Bio Basic 公司;碳酸酐酶(CA)、牛血

红蛋白(HG)、己糖基酶(HK)和卵清蛋白(Ov)购自 Worthington Biochemical 公司;多壁碳纳米管购自深圳纳米港;1-(3-二甲氨基 丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu)购自 Sigma-Aldrich 公司。

实验仪器:

1) Vario EL-III 型有机元素分析仪(Elementar Co.Ltd., Germany)

2) H-7500 投射电子显微镜(Hitachi Co.Ltd., Tokyo, Japan)

3) Nicolet 380 傅立叶变换红外光谱仪(Thermo Co.Ltd., USA)

4) F-4500 分子荧光分光光度计(Hitachi Co.Ltd., Tokyo, Japan)

5) J-810 圆二色谱仪(Jasco Co.Ltd., Tokyo, Japan)

6) ISS K2 多频相调制荧光寿命检测器(ISS, Inc., Champaign, IL, USA)

7) 超声波仪(Model KQ 218, 100W, 40kHz, Ultrasonic Instrument Co. Ltd, Kunshan, China)。

2.2.2 多壁碳纳米管的功能化

将多壁碳纳米管(f-MWNT-1)置于1:3混合的HNO₃/H₂SO₄溶液中, 60℃下超声3小时。然后倒入大量去离子水中,得到良好分散的黑色 溶液。将此溶液用0.22μm聚碳酸酯微孔滤膜过滤,然后用去离子水 充分洗涤至滤液pH值为7.0。将滤膜上的碳管真空干燥24小时,产物 用傅立叶变换红外光谱(FTIR)检测分析。红外谱图中在1720cm⁻¹处检 出峰表明多壁碳纳米管的底端已经被羧基化,原碳管表面出现缺陷。 得到的这种羧基化多壁碳纳米管(f-MWNT-2)能在水中或有机溶剂如 乙醇和四氢呋喃(THF)中溶解或具有良好的分散性。

在f-MWNT-2的基础上进行氨基化和酯化就可以得到多壁碳纳 米管进一步功能化产物。其典型功能化过程为:f-MWNT-2在THF中 用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺 (HOSu)活化30分钟,然后加入过量10倍的反应物,继续搅拌24小时 以确保反应完全。反应后的混合物用0.2um的PTFF膜过滤并用THF和 乙醇彻底清洗。产物真空干燥过夜,得到由氨基酸(f-MWNT-3)和异 丁胺(f-MWNT-4)修饰的多壁碳纳米管。

2.2.3 稳态荧光光谱

用去离子水(pH7)配制蛋白样品,浓度为50µg/mL;f-MWNTs分 散在乙醇溶液中,浓度为330µg/mL,实验中f-MWNTs由此浓度稀释 得到。在乙醇溶液中,所用四种碳纳米管均有良好的分散性(图2.1)。 检测蛋白质固有荧光,在蛋白溶液中逐次加入f-MWNTs,使f-MWNTs 的终浓度分别为0,1.1,2.3,4.6,9.3,18.7µg/mL,观察f-MWNTs对蛋 白质荧光的影响。记录340nm处荧光强度用于Stern-Volmer方程的计 算。激发波长280nm,发射波长340nm,荧光谱图的波长范围 300nm-400nm,扫描速度1200nm/min,激发和发射光狭缝均为 5.0nm(其中血红蛋白样品均为10.0nm),电压700V。本实验在室温 23℃条件下进行。



图 2.1. 实验中所用碳纳米管的分散性 1: f-MWNT-1; 2: f-MWNT-2; 3: f-MWNT-3; 4: f-MWNT-4

2.2.4 时间分辨荧光光谱

f-MWNT的终浓度为9.3μg/mL, 蛋白质浓度为500μg/mL, BSA 为800μg/mL。激发波长为280nm,标准参比为1mg/mL的牡蛎肝糖。

向3mL浓度为500µg/mL的蛋白溶液中加入40µL浓度为340µg/mL的多 壁碳纳米管,用相调制法在23℃下测量蛋白质自身荧光寿命的变化。 利用VINCI-Analysis 软件进行双指数拟合得到荧光寿命值用相调制 法得到荧光寿命。

2.2.5 圆二色谱

蛋白质和f-MWNT浓度同2.2.3,扫描波长为190nm-250nm,狭缝 宽度2.0nm,扫描速度500nm/min,样品池光程10nm,所测数据为三 次测量平均值。用Yang方程拟合计算得到蛋白质二级结构含量。

2.3 结果与讨论

2.3.1 多壁碳纳米管功能化修饰

通过在碳纳米管表面进行不同功能化修饰可以改变其表面性 质,使其显示出一些独特的性质,如疏水性、静电作用、氢键以及 空间位阻等,从而使其具有分子识别、特异性结合等特点。以未修 饰的碳纳米管 f-MWNT-1(直径为 10nm 或者 40nm)为原料得到表面 性质各异的几种功能化多壁碳纳米管 f-MWNT-2、f-MWNT-3、 f-MWNT-4(图 2.2)。其中 f-MWNT-2 为羧基化碳纳米管,在实验条 件下(pH 为中性)带负电,f-MWNT-4 则为中性。虽然 f-MWNT-3 在 试验条件下也带有负电性,但它却具有较大的空间位阻与疏水性。



图2.2. 实验中所用碳纳米管结构示意图

1: f-MWNT-1; 2: f-MWNT-2; 3: f-MWNT-3; 4: f-MWNT-4

f-MWNT-1和氧化后得到的f-MWNT-2的直径由透射电镜(TEM) 表征(图2.3); f-MWNTs上修饰的功能化基团由傅立叶转换红外光谱 (FTIR)(图2.4)和有机元素分析(表2.1)表征。在1713cm⁻¹处红外峰显 示f-MWNT-2上的羧基;元素分析显示f-MWNT-2的氮含量为0.08%, 而f-MWNT-3的氮含量为0.63%证明f-MWNT-3上连接上了含氮基团; 1713cm⁻¹处红外峰的消失和2957cm⁻¹、2850cm⁻¹处红外峰的增强证明 f-MWNT-4上连接上了甲基和亚甲基。



图 2.3. 实验中所用碳纳米管TEM图像, A为10nm的f-MWNT-1; B,为 10nm的 f-MWNT-2; C为40nm的f-MWNT-1; D,为40nm的f-MWNT-2



图 2.4. f-MWNT-1,2,3,4的 FTIR 谱图

f-MWNT-2在进行进一步功能化的时候,为了使反应能够进行完 全,加入了10倍过量的反应物,得到的f-MWNT-3用30%的嘧啶/甲基 甲酰胺溶液进行脱Fmoc反应,通过定量Fmoc得到f-MWNTs上羧基含 量为0.42±0.09 mmol/g。连接在f-MWNTs上氮元素的量由元素分析确 定,经计算为0.45mmol/g(表2.2),与Fmoc定量得到的结果一致,因 此我们认为在f-MWNTs的功能化过程中,修饰反应进行完全。

表2.1. f-MWNT-1,2,3,4的元素分析结果

f-MWNT	С%	Н%	N %	载量(mmol/g)
1	95.77	0.18	0.09	
2	84.94	0.63	0.08	
3	90.7±0.200	1.00±0.014	0.63±0.008	0.45±0.07
4	93.1±0.17	0.79±0.008	0.63±0.005	0.45±0.04

2.3.2 f-MWNT 与蛋白质的相互作用

2.3.2.1 蛋白质荧光

蛋白质包含三种含有荧光发色团的氨基酸残基:苯丙氨酸(Phe)、

酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)。这三种氨基酸共同的特点是具有一个共 轭π电子体系,容易与其它缺电子体系或π电子体系形成电荷转移复合 物。蛋白质的自身荧光主要来源于色氨酸和酪氨酸。大部分蛋白质的 荧光主要由色氨酸残基贡献。色氨酸残基和这些残基中的吲哚环是一 种特别灵敏、复杂的发色团,从其发射光谱中可以得到溶剂极性、底 物与蛋白的结合作用、缔合反应以及蛋白质的变性等信息^[83]。我们 首次用稳态荧光光谱研究了一系列蛋白质与f-MWNTs的相互作用, 蛋白三维结构和蛋白质分子信息如图2.5和表2.2所示。



图2.5. 实验中所用蛋白三维结构

蛋白质	来源	分子量	等电点pI	色氨酸数量
BSA	牛血清	66	4.7	3
HG	牛红血球	16.5	6.8	6
CA	牛红血球	30	6.3	14
НК	酵母	100	5.2	4
Ov	蛋白	45	4.6	12

表2.2. 实验中蛋白质来源、分子量、等电点和氨基酸信息

2.3.2.2 稳态荧光猝灭

蛋白质的自身荧光被f-MWNTs不同程度的猝灭(图2.6,附图2.1), 显示蛋白质与f-MWNTs之间发生了相互作用。由于测量中纳米碳管 对蛋白质荧光有散射作用,所以,以f-MWNT-2为例,扫描其荧光光 谱以考察纳米碳管的散射作用。F-MWNT-2在实验条件的浓度下,其 散射和荧光强度为蛋白质自身荧光强度的1/200。另外,f-MWNTs的 散射光本来应该增强蛋白荧光,但在加入f-MWNTs有蛋白质荧光猝 灭,因此f-MWNTs的散射或自身荧光在本实验中可以忽略。



图 2.6. 蛋白质 CA和 BSA 在用 f-M WNT-1, 2, 3, 4 滴 定前 和 滴 定 后 的 荧 光 强 度, f-M WNT 在 蛋白质 溶 液 中 的 浓 度 按 箭 头 指 向 依 次 为 0, 1.1, 2.3, 4.6, 9.3,

18.7µg/mL

根据Stern-Volmer方程,荧光猝灭与荧光猝灭剂浓度之间有一定的数量关系: $Fo/F = \tau_o/\tau = 1 + Ksv[Q]$, Fo、 $F和 \tau_o$ 、 τ 分别为猝灭前和猝灭后的荧光强度和荧光寿命, Ksv为蛋白质与猝灭剂的结合常数, [Q]为猝灭剂浓度。本实验中f-MWNTs即为荧光猝灭剂。在此等式中,由于MWNTs本身分子量和摩尔质量的不确定,所以f-MWNTs的浓度用 μ g/mL代替摩尔浓度。



图 2.7. 蛋白质荧光被 f-MWNT-1,2, 3, 4猝灭的 Stern-Volmer曲线



图2.8. 加入NaCl溶液以提高离子强度的条件下两种蛋白质被f-MWNT-1,2猝 灭的Stern-Volmer曲线。

图 2.7A-J为 f-MWNT-1,2,3,4 对实验所选的几种蛋白质猝灭的 Stern-Volmer曲线。图2.8K-N为加入NaCl溶液提高了离子强度的情况 下,其中两种蛋白质被f-MWNT-1,2猝灭的Stern-Volmer曲线。从图 2.8我们可以注意到一下几点:

1. 图2.7F-J与图2.7A-E比较, 直径为40nm的f-MWNTs与蛋白质结合 比直径为10nm的f-MWNTs与蛋白的结合要强。引起这一现象的原因 可能与f-MWNTs的曲率半径有关: 曲率半径大的纳米粒子与蛋白质 的接触面积大,所暴露的结构缺陷多一些; 而曲率半径小的纳米粒子 与蛋白质接触面积小,所暴露的结构缺陷相对曲率半径大的纳米粒子 要少些,从而导致结合蛋白的能力差异。这个结果与前人报道相一致。 在报道中指出直径大的硅纳米颗粒比直径小的纳米颗粒结合白要多 [84-86]

2.f-MWNT-2 对 蛋 白 质 荧 光 的 猝 灭 程 度 要 大 于 其 它 三 种 碳 管, f-MWNT-3 仅次于f-MWNT-2, f-MWNT-2是羧基化的碳管,在溶液中 显酸性,带负电荷,因此在f-MWNTs与蛋白质的相互作用中,静电 作用也起着至关重要的作用。

3.在加入NaCl溶液后BSA的荧光猝灭强度受f-MWNT-2的影响减小 (图2.8),而HK,HG则显示出了更强的猝灭效果。这说明f-MWNT-2 与蛋白质的相互作用是通过静电吸引的同时也与蛋白质自身的表面 所带电荷有关。本实验中所有蛋白质的等电点pI均小于7,所以在实 验条件下(pH=7.0),所有蛋白表面带有负电荷。由于f-MWNT-2带有 负电,所以在相互作用中带有负电的f-MWNT-2在静电作用下,与蛋 白质分子的中性或正点性氨基酸残基相结合。这种结合具体在蛋白质 的哪个氨基酸残基或者肽段则需要进一步的研究探讨。

4.体积大的蛋白质分子更容易与f-MWNTs相结合,这一现象有可能是由于体积大的蛋白质分子有更大的表面积和更多的氨基酸残基为结合提供了更多的空间。

5.f-MWNT-2的 Stern-Volmer曲线比其它碳纳米管的曲线有明显向上 折的现象,碳纳米管对蛋白质的猝灭是加速的或者是一个静态猝灭过 程,这种猝灭经常与蛋白质构象变化^[51]相关或者是有复合物形成。 荧光物质的荧光猝灭过程可以分为两种:动态猝灭和静态猝灭。动态 猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间所发生的相互作用过程, 如能量转移过程或电子转移过程。在某些情况下,可能生成瞬间的激 发态复合物,而这些激发态复合物可能不发射荧光或荧光的发射特性 与原先的荧光物质不同,从而引起荧光猝灭现象。静态猝灭是猝灭剂 和荧光物质分子在基态时发生配合反应,基态配合物的生成由于与未 配合的荧光物质的基态分子竞争吸收激发光而降低了荧光物质的荧 光强度。区分静态猝灭合动态猝灭最确切的方法是荧光寿命的测量。 在静态猝灭情况下,猝灭剂的存在并没有改变荧光分子激发态的寿 命,因此荧光寿命不发生改变的荧光猝灭一般为静态猝灭过程。在动

态猝灭情况下,猝灭剂的存在使荧光寿命缩短。我们测量蛋白质的荧 光寿命来进一步探讨f-MWNTs猝灭蛋白质荧光的方式。

2.3.2.3 蛋白质荧光寿命变化

图2.9为BSA和CA的相调制曲线,其它蛋白质的相调制曲线见附 图2.2。利用正弦调制光激发蛋白质分子,利用相衰减角和调制因子 计算激发态寿命。由于HG的荧光强度很弱,所以此方法并没有检测 到HG的荧光寿命。



图 2.9. BSA和CA经过双指数拟合后的相调制曲线,蛋白质的浓度除了BSA为 800µg/mL其余蛋白浓度均为500µg/mL,碳管的终浓度为9.3µg/mL,直径为 10nm。A: BSA+f-MWNT-2; B:BSA+f-MWNT-3; C: BSA+f-MWNT-4; D: BSA; E:

CA+ f-MWNT-2; F: CA+ f-MWNT-3; G: CA+ f-MWNT-4; H: CA

实验所使用的蛋白质均含有多个色氨酸残基,其荧光寿命要用双 指数曲线来拟合。拟合得到两个荧光寿命(表2.2),其中低于1ns的荧

光寿命用τ₁表示,其所占比例用f₁表示,较长的荧光寿命用τ₂表示, 其所占比例用f₂表示。产生两种荧光寿命的原因有:蛋白分子的异构 现象使基态含有多种状态;在激发态周围驰豫的时间;色氨酸荧光自 身存在着不同组分;色氨酸旋光异构体的存在;散射光或拉曼光的影 响。对于不同情况下的蛋白质,以上各种原因都有可能存在。

表 2.2. 蛋白质在加入不同纳米碳管前后的荧光寿命,τ₁和τ₂分别为蛋白质的 两个荧光寿命,f₁和f₂分别为相应荧光寿命的组分,X²为实验方差。

Title	τ ₁ (ns)	f ₁	τ ₂ (ns)	f ₂	X 2
BSA (800µg/mL) +	0.28±0.009	0.06±0.001	5.85±0.021	0.94	157
f-MWNT-2	0.07±0.003	0.21±0.001	5.99±0.025	0.79	84.6
f-MWNT-3	0.08±0.004	0.13±0.001	5.88±0.022	0.87	83.8
f-MWNT-4	0.11±0.007	0.08±0.001	5.81±0.021	0.93	116
CA(500µg/mL)+	0.08±0.008	0.17±0.001	5.14±0.022	0.83	401
f-MWNT-2	0.02±0.005	0.25±0.001	5.09±0.025	0.75	273
f-MWNT-3	0.18±0.007	0.19±0.002	5.18±0.024	0.82	403
f-MWNT-4	0.12±0.006	0.24±0.002	4.99±0.025	0.76	271
HK(500µg/mL) +	0.44±0.032	0.06±0.003	4.14±0.021	0.94	27.7
f-MWNT-2	1.79E-008±0.008	0.14±0.001	3.89±0.014	0.86	27.1
f-MWNT-3	0.05±0.016	0.12±0.002	4.06±0.019	0.88	24.1
f-MWNT-4	1.73E-008±0.005	0.12±0.001	4.25±0.014	0.88	180
Ov (500µg/mL) +	1.10±0.018	0.23±0.005	5.51±0.042	0.77	99.3
f-MWNT-2	0.09±0.006	0.25±0.002	4.75±0.024	0.75	275
f-MWNT- 3	0.10±0.005	0.27±0.002	4.27±0.025	0.73	42.2
f-MWNT-4	0.17±0.009	0.16±0.002	4.68±0.022	0.84	115

在本实验中蛋白质荧光寿命的变化非常微弱,因此,通过功能化修饰的f-MWNTs对蛋白质荧光的猝灭属于静态猝灭,蛋白质分子与碳纳米管之间的相互作用表现为形成稳定的基态配合物。

以BSA为例,加入f-MWNT-2和f-MWNT-3后,BSA的ti值降低, 其所占比例f1增加;而t2值基本没有变化,f2随着f1的增加相应减少。 由于tz是色氨酸的主要荧光寿命,它的值基本不变,说明蛋白质的 荧光猝灭是由静态猝灭过程所主导的。但是11的减少说明在静态猝 灭过程的同时存在着一定程度的动态猝灭。这一部分的荧光发色 团容易与碳纳米管发生碰撞而导致动态猝灭,说明它存在于蛋白 分子的表面或容易从蛋白内暴露到表面。随着碳纳米管的加入, 其所占比例的增加说明有正常的长寿命荧光向这种短寿命荧光转 化。由于在分子荧光光谱上观察到蛋白溶液中加入带有羧基的碳 纳米管后发射峰位置有少量红移,以及在园二色谱中发现蛋白α螺 旋结构有较为明显的减少,所以推测蛋白溶液中加入碳纳米管以 后、蛋白结构有轻度的松散,使得原来包裹在蛋白分子内部的荧 光闭暴露到溶液中,从而导致其发射峰红移以及短寿命荧光所占 比例的增加。总的来说,蛋白的荧光寿命基本没有发生变化,即 蛋白质的荧光猝灭为静态猝灭过程,所以蛋白质分子与碳纳米管 之间的相互作用表现为形成稳定的基态配合物。

2.3.2.4 蛋白质二级结构变化

任何一种蛋白质,在其自然状态或活性状态下,都具有特征而稳 定的三维结构,一旦这种特征的三维结构遭到破坏,蛋白质的生物功 能就会丧失。研究蛋白质暴露于碳纳米管后结构所受到的影响是研究 碳纳米管生物学毒性和应用的基础。蛋白质结构的变化可以用以下几 种方法来判断:蛋白质荧光发射峰位置的变化,荧光峰发生红移,说 明蛋白质结构变得松散,荧光团由蛋白质内部疏水腔暴露到溶剂中。 荧光峰发生蓝移,说明蛋白质结构紧缩;蛋白质荧光寿命的变化,蛋 白质的荧光寿命决定于蛋白质的种类和其三维结构,蛋白质结构变化 时,其荧光寿命偏离正常值,一般结构遭到破坏的蛋白质荧光寿命在 2.5nsec左右;蛋白质圆二色性的变化,圆二色谱(CD)可以给出蛋 白质二级结构的信息,因此是判断蛋白质结构变化的常用方法。

稳态荧光光谱和时间分辨荧光实验指出f-MWNT与蛋白质的相 互作用为形成稳定的基态配合物。f-MWNT-2对蛋白质荧光猝灭程度 很大,而且Srern-Volmer曲线有上折现象,这些现象表明在f-MWNT-2 与蛋白质结合的过程蛋白质的二级结构发生了变化,因此我们利用圆 二色谱测量了蛋白质的二级结构。BSA和CA在加入f-MWNTs前后的 CD信号随波长以及随光电倍增管电压的变化见图2.10,其它蛋白的 CD谱图见附图2.3。与长波段相比较,CD的光电倍增管电压在短波段 (200nm一下)随波长有较大的增高,这给CD信号造成了较大的噪音, 所以在通过Yang方程对CD信号进行拟合时我们舍掉了200nm一下的 信号。



Wavelength (nm)

图 2.10. BSA和 CA在直径为 10nm和 40nm的 f-MWNT-1,2,3,4作用下的的 CD 谱 图, f-MWNTs的浓度依次为 0,4.6,9.3,18.7 μg/mL,蛋白质的浓度均为

50µg/mL.

实验中所使用的蛋白质在190nm处有一正峰,在210nm和220nm 处有两个负峰。BSA与f-MWNT-2的CD信号无论碳管的直径10nm还 是40nm都有较大的改变,而BSA与f-MWNT-3的CD信号只有碳管直 径为40nm才有较大的改变。特别是f-MWNT-2导致BSA在222nm的负 峰由-80mdegree增加到-60mdegree。以Yang^[53]方程对CD数据进行拟 合(表2.3),在10nm碳管的影响下BSA二级结构中α-螺旋的含量减少 10%,β-转角和无规卷曲较少5%,而β-折叠则增加20%。在40nm碳管 影响下,除无规卷曲其它结构都有较大变化。实验中其它蛋白质的二 级结构计算结果在附表2.1中,CD结果印证了荧光猝灭结果并与之相 一致。

蛋白质	α-Helix (%)	β-Beta (%)	β–Turn (%)	Random (%	6) Total (%)
BSA+	31.60	16.80	20.30	31.30	100.00
10nm f-MWNT-1	31.20	14.80	20.30	31.30	100.00
10nm f-MWNT-2	22.00	37.70	14.90	25.40	100.00
10nm f-MWNT-3	22.70	37.10	15.00	25.20	100.00
10nm f-MWNT-4	24.50	35.90	13.00	26.60	100.00
40nm f-MWNT-1	27.30	26.10	16.90	29.60	100.00
40nm f-MWNT-2	24.80	23.70	18.90	32.50	100.00
40nm f-MWNT-3	26.00	25.20	17.10	31.70	100.00
40nm f-MWNT-4	25.20	27.70	16.30	30.80	100.00

表2.3. BSA-f-MWNTs样品中蛋白二级结构含量

2.4 结论

本章从碳管的表面修饰、电荷性质和直径大小的角度研究了纳米 碳管与蛋白质的相互作用,得到以下结论:

- 1. 蛋白质与f-MWNTs的相互作用受静电作用和表面化学等综合因素的共同影响。
- 2. 蛋白质与f-MWNTs的结合是生成了稳定的蛋白-MWNT复合物。根

据荧光寿命显示,与小分子对蛋白质荧光猝灭不同(主要是碰撞猝灭),碳纳米管对蛋白质荧光猝灭属于静态猝灭,生成了稳定的复合物。

- 3. 静电作用在蛋白质与f-MWNTs的相互作用中起着至关重要的作用。通过化学修饰,f-MWNTs表面带有负电荷或者不带电荷。虽然f-MWNT-1为表面没有修饰的碳纳米管,它与蛋白质通过π-π作用相互结合,但是表面带有负电荷的f-MWNT-2,3加强了这种纳米管与蛋白质的相互作用。在f-MWNT-4通过表面修饰上氨基,降低了电荷密度,则纳米管与蛋白的相互作用比f-MWNT-2,3有所减弱。
- 4. 体积大的蛋白与f-MWNTs的结合能力更强。体积大的蛋白质分子 有更大的表面积和更多的氨基酸残基为结合提供了更多的空间。
- 5. 直径大的f-MWNTs能结合较多的蛋白质。如图2.11所示,直径较大的f-MWNTs具有更多的结构缺陷,更容易与蛋白质结合。蛋白质在碳管上会改变自身构象,使之与碳管的曲率相协调。



图2.11. 蛋白质在半径不同的纳米碳管上的结合示意图

由上述结果可看出,蛋白质与f-MWNTs相互结合是静电作用和 表面化学综合作用的结果。f-MWNTs与不同的蛋白质结合时会导致 蛋白产生不同的荧光猝灭效果以及二级构象变化。蛋白质在生命活动 中是一种及其重要的大分子,蛋白质构象决定其生理功能。因此,通 过改变MWNT尺寸、形状、表面电荷或者表面化学基团可以调节其与 蛋白质的结合能力,从而改变生物毒性,提高生物适应性,优化MWNT 在纳米生物科技上的应用能力。

第三章 功能化多壁碳纳米管库与蛋白质相互作用的 筛选

3.1 引言

碳纳米管在生物医药上具有广阔的应用潜力,当将其注射到动物体内时,碳纳米管会进入各种器官组织,穿过细胞膜,甚至可以与蛋白质、DNA分子相结合。一种纳米材料的生物活性主要是由 其表面化学性质所调节,在碳纳米管表面连接上小分子等功能化修 饰可以使纳米碳管具有更好的生物适应性,进而使其在药物载体、 细胞成像、细胞探针、DNA 修复以及其它医疗诊断上得到更好的 应用。

利用组合化学原理对纳米材料表面进行修饰可以促使我们更 有效的设计化合物并快速的对化合物库进行筛选,从而得到具有活 性结构的化合物。

本课题组利用组合化学原理对碳纳米管表面进行功能化修饰, 获得了功能化修饰的碳纳米管库,本实验从蛋白质分子与碳纳米管 相互作用的角度,对库中碳管进行筛选评价。筛选出与几种重要蛋 白质结合能力较弱的 f-MWNTs,同时筛选出对酶活性抑制大的 f-MWNTs,为 f-MWNTs 在医药领域的应用提供了初步的理论依据。

3.2 实验材料和方法

3.2.1 试剂

牛血清白蛋白(BSA)购自 Bio Basic 公司。碳酸酐酶(CA)、牛血 红蛋白(HG) 购自 Worthington Biochemical 公司, 糜蛋白酶(CT)购 自 Sigma-Aldrich 公司。多壁碳纳米管购自深圳纳米港, 1-(3-二甲 氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu)购 自 Sigma-Aldrich 公司。其它试剂购自国药集团。

3.2.2 实验仪器

1) Vario EL-III 型有机元素分析仪(Elementar Co.Ltd., GERMANY)

2) H-7500 投射电子显微镜(Hitachi Co.Ltd., Tokyo, Japan)

3) Nicolet 380 傅立叶变换红外光谱仪(Thermo Co.Ltd., USA)

4) F-4500 分子荧光分光光度计(Hitachi Co.Ltd., Tokyo, JAPAN)

5) TU-1800PC 紫外可见分光光度计(Beijing Purkinje General Instrument Co. Ltd., Beijing, CHINA)。

6) 超声波仪(Model KQ 218, 100W, 40kHz, Ultrasonic Instrument Co. Ltd, Kunshan, China)。

3.2.3 功能化多壁碳纳米管库的合成

为了增加碳管表面羧基的数目,将上述产物缓缓加入至300mL 浓硝酸和浓硫酸的混合物(冰浴)中(体积比 1:3),加入完毕后 移去冰浴,将体系缓慢升温至 60℃加热 3 小时,反应完毕后冷却 至室温,将其倒入 1000mL 去离子水中,此时形成均匀分散的溶液, 重复上述离心及洗涤操作直至体系 pH 大约为 7.0,65℃真空干燥 24 小时,产物用 FTIR 分析。

碳管库的合成:将 Fmoc-TYR 修饰的碳纳米管溶于含 20% 哌 啶的 DMF 溶液中,50℃震荡 2 小时,4500 转每分钟离心产物 30 分钟,收集上清液,用 UV 光谱确定其 Fmoc 的含量,用乙醇洗涤 沉淀 5 次,真空干燥获得产物。

将每一种上述产物溶于 5mL 无水 THF 中,室温超声 15 分钟 使其分散,加入 500μL 对应的酰氯或磺酰氯及 300μL 吡啶作为缚 酸剂,60℃水浴中震荡 24 小时,加入乙醇终止反应。反应结束后 用离心或者过滤的方式纯化产物,用 HPLC 检测上清以监测纯化过 程,真空干燥获得最终产物。



图 3.1. 表面功能化多壁碳纳米管库合成路线示意图

3.2.4 稳态荧光光谱

用去离子水(pH7.0)配制蛋白样品。将碳纳米管分散在乙醇溶液 中,配制成浓度为 330µg/mL 的贮存液,稀释该贮存液用于本实验。 本实验所用四种碳纳米管在乙醇溶液中均有良好的分散性。为了检 测蛋白质固有荧光的变化,在蛋白溶液中逐次加入 f-MWNTs,使 f-MWNTs 的终浓度分别为 0, 1.1, 2.3, 4.6, 9.3, 18.7µg/mL,蛋白终 浓度为 50µg/mL,观察 f-MWNTs 对蛋白质荧光的影响。记录 340nm 处荧光强度用于 Stern-Volmer 方程的计算。荧光检测的条件为: 激发波长 280nm,发射波长 340nm,荧光谱图的波长范围为 300nm-400nm,扫描速度 1200nm/min,激发和发射光狭缝均为 5.0nm(其中血红蛋白样品均为 10.0nm),电压 700V。本实验进行的 温度为 23℃。

3.2.5 糜蛋白酶活性的抑制

用 25mM Tris-HCl 缓冲溶液 (pH=7.6)配制 CT 溶液;将 f-MWNTs 分散在去离子水中,配制成浓度为 200µg/mL 贮存液。将 f-MWNTs 加入到 CT 溶液中,23℃下孵育 3h,加入底物 SPNA, 混合物中 CT 浓度为 80µg/mL, f-MWNTs 浓度为 40µg/mL, SPNA 浓度为 1.8mM。记录 10min 内 405nm 处紫外吸光度的变化,以 A_{405nm} 对时间作图,得到直线斜率即为此酶催化反应的反应初速度 v₀。加入 f-MWNTs 后 CT 的酶活性受到不同程度的抑制,酶催化 反应的反应初速度为v_i,酶活性的抑制百分数为 i%=1-v_i/v₀,筛选 出对酶活性抑制较强的 f-MWNTs。

3.3 结果与讨论

					R	R,'N-			
			1-N	 AM003			(n-₹ <u>am006</u>		F3C AM008
		5	6	7	8	9	10	11	12
	H{ De-Fmoc	13	14	15	16	17	18	19	20
	옷, AC001	21	29	37	45	53	61	69	77
	AC002	22	30	38	46	54	62	70	78
	0 0 AC003	23	31	39	47	55	63	71	79
R2-	02N	24	32	40	48	56	64	72	80
		25	33	41	49	57	65	73	81
	()-8 AC006	26	34	42	50	58	66	74	82
	-0-8: AC007	27	35	43	51	59	67	75	83
	02N 0-5i AC008	28	36	44	52	60	68	76	84

3.3.1 功能化多壁碳纳米管库的设计

图 3.2. 组合化学方法合成的 f-MWNTs 库组合示意图

表面修饰分子化学性质的多样性由分子官能团的多样性决定, 因此,在此 f-MWNTs 库的设计中,我们通过 Accelrys 公司的 Accord and Pipeline Pilot 软件计算选择了高度多样性的官能团,包括 31 种氨基酸和 26 种酰胺。选择了 8 种氨基酸和 9 种酰胺基团进行组 合化学化合物库的合成,它们在诸如结构、疏水性质、水溶性、拓 扑结构、立体构象等分子性质方面具有很大的差异。合成的组合化 学功能化多壁碳纳米管库包含 80 种 f-MWNTs 图 3.2 所示。通过计 算库中多壁碳纳米管表面修饰的基团发现其具有最大的差异性和 物理化学性质。

3.3.2 功能化多壁碳纳米管库的表征

采用傅立叶转换红外光谱(FTIR)对 f-MWNTs 上修饰的功能 化基团进行表征 (图 3.3)。MWNT-001 为表面没有基团修饰的碳 管,在 1713cm⁻¹处的红外峰表明 MWNT-002 表面被氧化得到羧基; MWNT-003 是碳管表面羧基与 Fmoc-Tyr 反应得到,在 1710cm⁻¹ 初的红外峰为形成的酯和羧基的峰叠加的结果; MWNT-005 为 MWNT-003 氨基化产物,1710cm⁻¹处红外峰的消失和 2924cm⁻¹、 2843cm⁻¹处红外峰的增强证明 MWNT-005 上连接了甲基和亚甲基。 1787cm⁻¹处红外峰表明 MWNT-073 含有羧酸酯。



图 3.3. f-MWNTs 库中几种典型碳纳米管的红外谱图

此外从图 3.1 的 TEM 图可以看出,在 f-MWNTs 表面修饰上不同的官能团后 f-MWNTs 的外表形状并没有改变,并且实验证明将功能化碳纳米管分散于水溶液中,可以在室温稳定 2 个月。

从图 3.4 的 HPLC 谱图可以看出, f-MWNTs 库经纯化后, 表面 没有残留溶剂污染。



图 3.4. MWNT-031 经离心后纯化溶剂的 HPLC 谱图

3.3.3 稳态荧光光谱

与蛋白质结合能力提高可以使纳米材料的调理作用得到提高, 比如清理能力或者隐秘的抗原决定簇的信号传导等。从第二章得到 的结果可以看出蛋白质荧光猝灭程度可以间接反应出蛋白质与 f-MWNTs 结合的信息,荧光猝灭越严重则蛋白质与 f-MWNTs 结合 的越多,相反则越少。采用荧光猝灭方法对 f-MWNTs 库的筛选可 以间接表达蛋白质与 f-MWNTs 的结合情况。

图 3.5 分别为 BSA、碳酸酐酶、血红蛋白、糜蛋白酶与 f-MWNTs 结合后的荧光猝灭情况,由图中可以看出,不同功能化修饰的 f-MWNTs 对蛋白质荧光的猝灭程度是不同的。结果表明:通过组 合化学表面功能化修饰后 f-MWNTs 的蛋白质结合能力与原料 f-MWNT-002 相比得到增强。对实验结果进行整体分析发现,酰胺 AC005 基团对四种蛋白质的荧光猝灭程度都比较弱,因此此基团 是一种重要的基团,且在前一章中讨论了蛋白质二级构象受 f-MWNTs的影响很小,因此 f-MWNTs 具有较大的应用潜力。



图 3.5. 四种蛋白与 f-MWNTs 结合后的荧光猝灭图

3.3.4 糜蛋白酶的活性抑制

前面研究了 f-MWNTs 库中碳管与多种蛋白质的结合情况,其中 CT 是一种具有重要活性的酶,因此本实验进一步研究了 f-MWNTs 对该酶活性的抑制情况。从图 3.6 可以看出 f-MWNTs 对 酶的抑制情况差异很大。其中 AM002 基团对酶活性具有较强的抑制作用。可以推测带有 AM002 基团的碳纳米管可能特异性的结合

在 CT 的活性位点或者活性位点附近,从而阻碍底物分子与酶发生 反应。而从荧光猝灭中可以看出,含有 AM002 基团的碳管与 CT 的结合并不是最多的,我们推测该类碳管具有很好的靶向性,可以 高效的与 CT 活性位点附近相结合,从而具有很高的生物特异性。



图 3.6 f-MWNTs 库对 CT 活性的抑制百分数

3.4 结论

本实验对表面功能化修饰的多壁碳纳米管库在与蛋白质结合 能力及对酶活性抑制方面进行了筛选。筛选出分别在蛋白质结合和 酶活性抑制方面具有特异性的碳管。首先, 酰胺 AC005 基团的碳 管与蛋白结合能力均较弱,且对蛋白质二级构象的破坏较小,具有 很大的应用潜力。而 AM002 基团对糜蛋白酶活性的抑制较大,可 以推测其与 CT结合部位在酶的活性位点附近,具有很好的靶向性, 同样具有较大的应用潜力。

附图和附表

附图 2.1 A-40nm, A-10nm, B-40nm, B-10nm, C-40nm, C-10nm 分别 为 HG, HK, Ov 在用不同直径 f-MWNT-1, 2, 3, 4 滴定前和滴定后的 荧光强度, f-MWNTs 在蛋白质溶液中的浓度按箭头指向依次为 0, 1.1, 2.3, 4.6, 9.3, 18.7µg/m。

A-40nm

A-10nm











C-40nm

C-10nm



附图 2.2 蛋白质经过双指数拟合后的相调制曲线, a)为 HK, b)为 Ov,蛋白质的浓度 500µg/mL,碳管的终浓度为 9.3µg/mL,f-MWNTs 直径为 10nm, 以及乙醇的 control。

a)





附图 2.3 HG, HK 和 Ov 在直径为 10nm 和 40nm 的 f-MWNT-1,2,3,4 作用 下的的 CD 谱图, f-MWNTs 的浓度依次为 0, 4.6, 9.3, 18.7µg/mL, 蛋白质 的浓度均为 50µg/mL。

a) 10nm f-MWNTs





b) 40nm f-MWNTs





Wavelength(nm)

附表 2.1 蛋白质在 f-MWNTs 作用下的二级结构变化

		CA+ f-MWNT-2	CA+ f-MWNT-2	CA+ f-MWNT-2
	CA	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	10.70%	13.60%	14.00%
Beta:	39.00%	46.30%	38.80%	36.80%
Turn:	19.90%	15.10%	19.80%	19.90%
Random:	28.40%	27.90%	27.80%	29.20%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		CA+ f-MWNT-3	CA+ f-MWNT-3	CA+ f-MWNT-3
	ĊA	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	11.40%	13.50%	12.80%
Beta:	39.00%	45.50%	58.20%	37.90%
Turn:	19.90%	17.10%	6.30%	19.70%
Random:	28.40%	25.90%	22.00%	29.60%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		CA+ f-MWNT-4	CA+ f-MWNT-4	CA+ f-MWNT-4
	CA	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	13.10%	12.80%	16.60%
Beta:	39.00%	40.90%	40.60%	43.40%
Turn:	19.90%	19.70%	18.40%	16.80%
Random:	28.40%	26.20%	28.30%	23.30%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		CA+ f-MWNT-1	CA+ f-MWNT-1	CA+ f-MWNT-1
	CA	$(4.4 \mu g/mL)$	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	11.60%	11.60%	13.20%
Beta:	39.00%	42.10%	42.00%	44.10%
Turn:	19.90%	18.50%	18.00%	16.50%
Random:	28.40%	27.80%	28.40%	26.30%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		CA+ EtOH	CA+ EtOH	CA+ EtOH
	CA	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	10.50%	11.80%	11.80%
Beta:	39.00%	44.20%	42.30%	42.60%
Turn:	19.90%	16.90%	17.30%	17.00%
Random:	28.40%	28.30%	28.50%	28.70%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
	HG	HG+ f-MWNT-2	HG+ f-MWNT-2	HG+ f-MWNT-2
				•

a) iunii 1-ivi w N I	a)	10nm	f-MWNT
----------------------	----	------	--------

		(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	54.10%	37.90%	43.10%
Beta:	23.80%	0.00%	4.10%	10.90%
Turn:	6.50%	14.00%	24.20%	16.20%
Random:	27.40%	31.90%	33.80%	29.80%
Total: 100.00%		100.00%	100.00%	100.00%
		HG+ f-MWNT-3	HG+ f-MWNT-3	HG+ f-MWNT-3
	HG	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	38.80%	44.80%	45.30%
Beta:	23.80%	12.90%	22.30%	21.90%
Turn:	6.50%	16.90%	6.50%	6.90%
Random:	27.40%	31.40%	26.40%	25.80%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		HG+ f-MWNT-4	HG+ f-MWNT-4	HG+ f-MWNT-
	HG	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	52.70%	43.30%	40.80%
Beta:	23.80%	29.00%	16.20%	11.30%
Turn:	6.50%	0.00%	12.30%	17.00%
Random:	27.40%	18.30%	28.20%	31.00%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		HG+ f-MWNT-1	HG+ f-MWNT-1	HG+ f-MWNT-
	HG	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	47.30%	42.50%	49.40%
Beta:	23.80%	21.10%	19.40%	26.90%
Turn:	6.50%	6.90%	10.10%	1.40%
Random:	27.40%	24.80%	28.00%	22.20%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		HG+ EtOH	HG+ EtOH	HG+ EtOH
	HG	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	47.30%	43.90%	. 51.60%
Beta:	23.80%	21.10%	18.50%	28.80%
Turn:	6.50%	6.90%	10.20%	0.00%
		a 4 a a 4	27 409/	10 (00/
Random:	27.40%	24.80%	21.40%	19.00%
Random: Total:	27.40% 100.00%	24.80% 100.00%	100.00%	19.80%
Random: Total:	27.40% 100.00%	100.00%	100.00%	19.80%
Random: Total:	27.40%	24.80% 100.00% HK+ f-MWNT-2	100.00% HK+ f-MWNT-2	19.00% 100.00% HK+ f-MWNT
Random: Total:	27.40% 100.00% HK	24.80% 100.00% HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL)	27.40% 100.00% HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL)	19.80% 100.00% HK+ f-MWNT (17.6μg/mL)
Random: Total: Helix:	27.40% 100.00% HK 23.80%	24.80% 100.00% HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20%	27.40% 100.00% HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50%	19.80% 100.00% HK+ f-MWNT (17.6μg/mL) 32.70%
Random: Total: Helix: Beta:	27.40% 100.00% HK 23.80% 12.40%	24.80% 100.00% HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70%	27.40% 100.00% HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40%	19.80% 100.00% HK+ f-MWNT- (17.6μg/mL) 32.70% 12.80%

.

Random:	100.00%	31.00%	29.10%	33.90%
Total:		100.00%	100.00%	100.00%
	uv	HK+ f-MWNT-3	HK+ f-MWNT-3	HK+ f-MWNT-3
	пк	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	23.80%	37.40%	33.40%	36.00%
Beta:	12.40%	18.40%	15.40%	16.70%
Turn:	27.10%	16.10%	18.80%	16.60%
Random:	100.00%	28.20%	32.50%	30.70%
Total:		100.00%	100.00%	100.00%
	1112	HK+ f-MWNT-4	HK+ f-MWNT-4	HK+ f-MWNT-4
	нк	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	23.80%	36.00%	35.50%	33.00%
Beta:	12.40%	23.40%	18.10%	20.00%
Turn:	27.10%	13.10%	16.50%	17.20%
Random:	100.00%	27.60%	29.90%	29.80%
Total:		100.00%	100.00%	100.00%
		HK+ f-MWNT-1	HK+ f-MWNT-1	HK+ f-MWNT-1
	НК	$(4.4 \mu g/mL)$	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	23.80%	36.10%	36.40%	35.30%
Beta:	12.40%	18.30%	21.10%	20.10%
Turn:	27.10%	16.40%	15.20%	15.70%
Random:	100.00%	29.20%	27.30%	28.90%
Total:		100.00%	100.00%	100.00%
		HK+ EtOH	HK+ EtOH	HK+ EtOH
	HK	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	23.80%	36.00%	36.50%	35.50%
Beta:	12.40%	20.90%	21.00%	19.10%
Turn:	27.10%	15.40%	14.70%	15.40%
Random:	100.00%	27.70%	27.80%	30.00%
Total:		100.00%	100.00%	100.00%
		Ov+ f-MWNT-2.	Ov+ f-MWNT-2	Ov+ f-MWNT-2
	Öv	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	39.50%	40.60%	36.60%	40.00%
Beta:	21.70%	17.90%	16.90%	16.60%
Turn:	8.30%	9.80%	14.80%	10.20%
Random:	30.50%	31.70%	31.70%	33.20%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		Ov+ f-MWNT-3	Ov+ f-MWNT-3	Ov+ f-MWNT-3
	Öv	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)

山东大学硕士学位论文

Helix:	39.50%	47.30%	36.00%	51.20%
Beta:	21.70%	4.80%	17.40%	22.90%
Turn:	8.30%	15.30%	14.30%	3.50%
Random:	30.50%	32.60%	32.20%	22.40%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		Ov+ f-MWNT-4	Ov+ f-MWNT-4	Ov+ f-MWNT-4
	Öv	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	39.50%	40.10%	50.00%	38.10%
Beta:	21.70%	14.30%	26.40%	19.70%
Turn:	8.30%	13.70%	0.00%	11.20%
Random:	30.50%	31.90%	23.60%	30.90%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		Ov+ f-MWNT-1	Ov+ f-MWNT-1	Ov+ f-MWNT-1
	Öv	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	39.50%	39.30%	46.00%	38.10%
Beta:	21.70%	17.40%	14.70%	18.70%
Turn:	8.30%	10.80%	13.40%	12.00%
Random:	30.50%	32.40%	25.90%	31.20%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		Ov+ EtOH	Ov+ EtOH	Ov+ EtOH
	Öv	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	39.50%	43.20%	42.60%	43.00%
Beta:	21.70%	11.70%	8.90%	14.40%
Turn:	8.30%	13.40%	15.60%	11.30%
Random:	30.50%	31.70%	32.90%	31.30%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

b) 40nm f-MWNTs

		CA+ f-MWNT-2	CA+ f-MWNT-2	CA+ f-MWNT-2
	CA	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	10.70%	13.60%	14.00%
Beta:	39.00%	46.30%	38.80%	36.80%
Turn:	19.90%	15.10%	19.80%	19.90%
Random:	28.40%	27.90%	27.80%	29.20%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		CA+ f-MWNT-3	CA+ f-MWNT-3	CA+ f-MWNT-3
	CA	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	11.40%	13.50%	12.80%
Beta:	39.00%	45.50%	58.20%	37.90%
•				

,

Turn:	19.90%	17.10%	6.30%	19.70%
Random:	28.40%	25.90%	22.00%	29.60%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		CA+ f-MWNT-4	CA+ f-MWNT-4	CA+ f-MWNT-4
	СА	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	13.10%	12.80%	16.60%
Beta:	39.00%	40.90%	40.60%	43.40%
Turn:	19.90%	19.70%	18.40%	16.80%
Random:	28.40%	26.20%	28.30%	23.30%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		CA+ f-MWNT-1	CA+ f-MWNT-1	CA+ f-MWNT-1
	CA	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	11.60%	11.60%	13.20%
Beta:	39.00%	42.10%	42.00%	44.10%
Turn:	19.90%	18.50%	18.00%	16.50%
Random:	28.40%	27.80%	28.40%	26.30%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		CA+ EtOH	CA+ EtOH	CA+ EtOH
	CA	$(4.4 \mu g/mL)$	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	12.70%	10.50%	11.80%	11.80%
Beta:	39.00%	44.20%	42.30%	42.60%
Turn:	19.90%	16.90%	17.30%	17.00%
Random:	28.40%	28.30%	28.50%	28.70%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		HG + f-MWNT-2	HG + f-MWNT-2	HG f-MWNT-2
	HG	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	54.10%	37.90%	43.10%
Beta:	23.80%	0.00%	4.10%	10.90%
Turn:	6.50%	14.00%	24.20%	16.20%
Random:	27.40%	31.90%	33.80%	29.80%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		HG + f-MWNT-3	HG + f-MWNT-3	HG f-MWNT-3
	HG	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6μγ/mL)
Helix:	42.30%	38.80%	44.80%	45.30%
Beta:	23.80%	12.90%	22.30%	21.90%
Turn:	6.50%	16.90%	6.50%	6.90%
Random:	27.40%	31.40%	26.40%	25.80%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
	HG	HG + f-MWNT-4	HG + f-MWNT-4	HG f-MWNT-4

山东大学硕士学位论文

.

		(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	52.70%	43.30%	40.80%
Beta:	23.80%	29.00%	16.20%	11.30%
Turn:	6.50%	0.00%	12.30%	17.00%
Random:	27.40%	18.30%	28.20%	31.00%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
	ЧC	HG+ f-MWNT-1	HG + f-MWNT-1	HG f-MWNT-1
		(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	47.30%	42.50%	49.40%
Beta:	23.80%	21.10%	19.40%	26.90%
Turn:	6.50%	6.90%	10.10%	1.40%
Random:	27.40%	24.80%	28.00%	22.20%
	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
	ЧС	HG+ EtOH	HG + EtOH	HG EtOH
	но	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	42.30%	47.30%	43.90%	51.60%
Beta:	23.80%	21.10%	18.50%	28.80%
Turn:	6.50%	6.90%	10.20%	0.00%
Random:	27.40%	24.80%	27.40%	19.60%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		HK+ f-MWNT-2	HK+ f-MWNT-2	HK+ f-MWNT-2
	НК	HK+ f-MWNT-2 (4.4μg/mL)	HK+ f-MWNT-2 (8.8μg/mL)	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL)
Helix:	НК 36.70%	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50%	HK+ f-MWNT-2 (17.6μg/mL) 32.70%
Helix: Beta:	HK 36.70% 23.80%	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40%	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80%
Helix: Beta: Turn:	HK 36.70% 23.80% 12.40%	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70% 17.10%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10%	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50%
Helix: Beta: Turn: Random:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10%	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00%	HK+ f-MWNT-2 (8.8μg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10%	HK+ f-MWNT-2 (17.6μg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90%
Helix: Beta: Turn: Random: Total:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00%	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00%	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00%
Helix: Beta: Turn: Random: Total:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00%	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3
Helix: Beta: Turn: Random: Total:	НК 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% НК	HK+ f-MWNT-2 (4.4μg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4μg/mL)	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8µg/mL)	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6µg/mL)
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70%	HK+ f-MWNT-2 (4.4μg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4μg/mL) 37.40%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8µg/mL) 33.40%	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6µg/mL) 36.00%
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70% 23.80%	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4µg/mL) 37.40% 18.40%	HK+ f-MWNT-2 (8.8μg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8μg/mL) 33.40% 15.40%	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6µg/mL) 36.00% 16.70%
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta: Turn:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70% 23.80% 12.40%	HK+ f-MWNT-2 (4.4μg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4μg/mL) 37.40% 18.40% 16.10%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8µg/mL) 33.40% 15.40% 18.80%	HK+ f-MWNT-2 (17.6μg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6μg/mL) 36.00% 16.70% 16.60%
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta: Turn: Random:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10%	HK+ f-MWNT-2 (4.4μg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4μg/mL) 37.40% 18.40% 16.10% 28.20%	HK+ f-MWNT-2 (8.8μg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8μg/mL) 33.40% 15.40% 18.80% 32.50%	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6µg/mL) 36.00% 16.70% 16.60% 30.70%
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta: Turn: Random: Total:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00%	HK+ f-MWNT-2 (4.4μg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4μg/mL) 37.40% 18.40% 16.10% 28.20% 100.00%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8µg/mL) 33.40% 15.40% 18.80% 32.50% 100.00%	HK+ f-MWNT-2 (17.6μg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6μg/mL) 36.00% 16.70% 16.60% 30.70% 100.00%
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta: Turn: Random: Total:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00%	HK+ f-MWNT-2 (4.4μg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4μg/mL) 37.40% 18.40% 16.10% 28.20% 100.00% HK+ f-MWNT-4	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8µg/mL) 33.40% 15.40% 18.80% 32.50% 100.00% HK+ f-MWNT-4	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6µg/mL) 36.00% 16.70% 16.60% 30.70% 100.00% HK+ f-MWNT-4
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta: Turn: Random: Total:	НК 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% НК 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% НК	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4µg/mL) 37.40% 18.40% 16.10% 28.20% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (4.4µg/mL)	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8µg/mL) 33.40% 15.40% 18.80% 32.50% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (8.8µg/mL)	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6µg/mL) 36.00% 16.70% 16.60% 30.70% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (17.6µg/mL)
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70%	HK+ f-MWNT-2 (4.4μg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4μg/mL) 37.40% 18.40% 16.10% 28.20% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (4.4μg/mL) 36.00%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8µg/mL) 33.40% 15.40% 18.80% 32.50% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (8.8µg/mL) 35.50%	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6µg/mL) 36.00% 16.70% 16.60% 30.70% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (17.6µg/mL) 33.00%
Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta: Turn: Random: Total: Helix: Beta:	HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70% 23.80% 12.40% 27.10% 100.00% HK 36.70% 23.80%	HK+ f-MWNT-2 (4.4µg/mL) 33.20% 18.70% 17.10% 31.00% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (4.4µg/mL) 37.40% 18.40% 16.10% 28.20% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (4.4µg/mL) 36.00% 23.40%	HK+ f-MWNT-2 (8.8µg/mL) 35.50% 16.40% 19.10% 29.10% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (8.8µg/mL) 33.40% 15.40% 18.80% 32.50% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (8.8µg/mL) 35.50% 18.10%	HK+ f-MWNT-2 (17.6µg/mL) 32.70% 12.80% 20.50% 33.90% 100.00% HK+ f-MWNT-3 (17.6µg/mL) 36.00% 16.70% 16.60% 30.70% 100.00% HK+ f-MWNT-4 (17.6µg/mL) 33.00% 20.00%

Random:	27.10%	27.60%	29.90%	29.80%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
	1112	HK+ f-MWNT-1	HK+ f-MWNT-1	HK+ f-MWNT-1
	нк	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	36.70%	36.10%	36.40%	35.30%
Beta:	23.80%	18.30%	21.10%	20.10%
Turn:	12.40%	16.40%	15.20%	15.70%
Random:	27.10%	29.20%	27.30%	28.90%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
	1112	HK+ EtOH	HK+ EtOH	HK+ EtOH
	нк	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	36.70%	36.00%	36.50%	35.50%
Beta:	23.80%	20.90%	21.00%	19.10%
Turn:	12.40%	15.40%	14.70%	15.40%
Random:	27.10%	27.70%	27.80%	30.00%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
······································		Ov+ f-MWNT-2	Ov+ f-MWNT-2	Ov+ f-MWNT-2
	Ov	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	39.50%	40.60%	36.60%	40.00%
Beta:	21.70%	17.90%	16.90%	16.60%
Turn:	8.30%	9.80%	14.80%	10.20%
Random:	30.50%	31.70%	31.70%	33.20%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		Ov+ f-MWNT-3	Ov+ f-MWNT-3	Ov+ f-MWNT-3
	00	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	39.50%	47.30%	36.00%	51.20%
Beta:	21.70%	4.80%	17.40%	22.90%
Turn:	8.30%	15.30%	14.30%	3.50%
Random:	30.50%	32.60%	32.20%	22.40%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		Ov+ f-MWNT-4	Ov+ f-MWNT-4	Ov+ f-MWNT-4
	Öv	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	39.50%	40.10%	50.00%	38.10%
Beta:	21.70%	14.30%	26.40%	19.70%
Turn:	8.30%	13.70%	0.00%	11.20%
Random:	30.50%	31.90%	23.60%	30.90%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		Ov+ f-MWNT-1	Ov+ f-MWNT-1	Ov+ f-MWNT-1
	Öv	(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)

山东大学硕士学位论文

.

山东大学硕士学位论文				
Helix:	39.50%	39.30%	46.00%	38.10%
Beta:	21.70%	17.40%	14.70%	18.70%
Turn:	8.30%	10.80%	13.40%	12.00%
Random:	30.50%	32.40%	25.90%	31.20%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
	Ov	Ov+ f-MWNT-1	Ov+ EtOH	Ov+ EtOH
		(4.4µg/mL)	(8.8µg/mL)	(17.6µg/mL)
Helix:	39.50%	43.20%	42.60%	43.00%
Beta:	21.70%	11.70%	8.90%	14.40%
Turn:	8.30%	13.40%	15.60%	11.30%
Random:	30.50%	31.70%	32.90%	31.30%
Total:	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

•

参考文献

- Mattson, M.P.; Haddon, R.C.; Rao, A.M., Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth [J]. Mol Neurosci 2000, 14, (3), 175-182.
- Lin, Y.; Taylor, S.; Li, H.; Fernando, K. A. S.; Qu, L.; Wang, W.; Gu, L.; Zhou, B.; Sun, Y.-P., Advances toward bioapplications of carbon nanotubes [J]. J. Mater. Chem. 2004, 14, (4), 527-541.
- Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M., Applications of carbon nanotubes in drug delivery [J]. Curr. Opin. Chem. Biol. 2005, 9, (6), 674-679.
- Kam, N. W. S.; Liu, Z.; Dai, H., Functionalization of Carbon Nanotubes via Cleavable Disulfide Bonds for Efficient Intracellular Delivery of siRNA and Potent Gene Silencing [J]. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, (36), 12492-12493.
- Gao, L. Z.; Nie, L.; Wang, T. H.; Qin, Y. J.; Guo, Z. X.; Yang, D. L.; Yan, X. Y., Carbon nanotube delivery of the GFP gene into mammalian cells [J]. Chem. Biochem. 2006, 7, (2), 239-242.
- Klumpp, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A., Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics [J]. Biochim. Biophys. Acta 2006, 1758, (3), 404-412.
- Liu, Z.; Cai, W.; He, L.; Nakayama, N.; Chen, K.; Sun, X.; Chen, X.; Dai, H., In Vivo Biodistribution and Highly Efficient Tumor Targeting of Carbon Nanotubes in Mice [J]. Nat. Nanotechnol. 2007, 2, 47-52.
- 8. Colvin, V. L., The potential environmental impact of engineered nanomaterials [J]. Nature Biotech. 2003, 21, 1166-1170.
- Dowling, A.; Clift, R.; Grobert, N., Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. London: The Royal Society& The Royal Academy of Engineering Report, Jul

2004.

- Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A., Carbon nanotubes-the route toward applications [J]. Science 2002, 297, 787-792.
- 11.Brumfiel, G., Nanotechnology a little knowledge [J]. Nature 2003, 424, 246-248.
- Zhang, W. X., Environmental technologies at the nanoscale [J]. Environ Sci Technol 2003, 37, (5), 103-108.
- 13.Kelly, K. L., Nanotechnology grows up [J]. Science 2004, 304, 1732-1734.
- 14. Shvedova, A.; Castranova, V.; Kisin, E. R.; Schwegler-Berry, D.; Murray, A. R.; Gandelsman, V. Z.; Maynard, A.; Baron, P., Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. [J]. J. Toxicol. EnViron. Health, A 2003, 66, 1909-1926.
- Fiorito, S.; Serafino, A.; Andreola, F.; Togna, A.; Togna, G., Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. [J]. J. Nanosci. Nanotechnol. 2006, 6, 591-599.
- 16.Lam, C. W.; James, J. T.; McCluskey, R.; Arepalli, S.; Hunter, R. L., A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks [J]. *Critical Rev. Toxicol.* 2006, 36, 189-217.
- 17. Wang, H.; Wang, J.; Deng, X.; Sun, H.; Shi, Z.; Gu, Z.; Liu, Y.;
 Zhao, Y., Preparation and biodistribution of 1251-labeled water-soluble single-wall carbon nanotubes [J]. J. Nanosci. Nanotech. 2004, 4, (8), 1019-1024.
- 18. Singh, R.; Pantarotto, D.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Klumpp, C.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K., Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers [J]. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103, 3357-3362.

- Cherukuri, P.; Bachilo, S. M.; Litovsky, S. H.; Weisman, R. B., Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells [J]. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, (48), 15638.
- 20.Kam, N. W. S.; Jessop, T. C.; Wender, P. A.; Dai, H., Nanotube Molecular Transporters: Internalization of Carbon Nanotube-Protein Conjugates into Mammalian Cells [J]. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, (22), 6850-6851.
- 21.Pantarotto, D.; Briand, J-P.; Prato, M.; Bianco, A., Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes
 [J]. Chem. Commun. 2004, 7, 16-17.
- 22. Pantarotto, D.; Singh, R.; McCarthy, D.; Erhardt, M.; Briand, J. P.; Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A., Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery [J]. Angew. Chem., Int. Ed. 2004, 43, (39), 5242-5246.
- 23.Kam, N. W. S.; Liu, Z.; Dai, H., Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA:An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway [J]. Angew. Chem., Int. Ed. 2006, 45, 577-581.
- 24. Service, R. F., Nanomaterials show signs of toxicity [J]. Science 2003, 300, (11), 243.
- 25.Nel, A., Xia, T.; Madler, L.; Li, N., Toxic potential of materials at the nanolevel. [J]. Science 2006, 311, 622-627.
- 26. Maynard, A. D.; Aitken, R.J.; Butz, T.; Colvin, V.; Donaldson, K.;
 Oberdörster, G.; Philbert, M. A.; Ryan, J.; Seaton, A.; Stone, V.; Tinkle, S.
 S.; Tran, L.; Walker, N. J.; Warheit, D.B., Safe handling of nanotechnology [J]. Nature 2006, 444, 267-269.
- 27. Scheulefe, D.A.; Corley, E. A.; Dunwoody, S.; Shih, T. J.; Hillback, E.; Guston, D. H., Scientists worry about some risks more than the public [J]. Nature Nanotechnology 2007, 2, 732-734.
- 28. Lynch, I.; Dawson, K. A.; Linse, S., Detecting cryptic epitopes

created by nanoparticles [J]. Sci. STKE. 2006, (327), 14.

- 29. Iijima S., Helical microtubules of graphitic carbon [J]. Nature 1991, 354, 56-58.
- 30. Hui, B. N.; Fukunagai, H.; Lu, C., Prediction of elastic properties of carbon nanotube reinforced composites [J]. Proc. R. Soc. A 2005, 461, 1685-1710.
- 31.Duan, X.; Akdim, B.; Pachter, R., A theoretical study of Cs adsorption at tips of single-wall carbon nanotubes: field emission properties [J]. Appl. Surf. Sci. 2005, 243, 11-18.
- 32. Sotiropoulou, S.; Chaniotalds, N. A., Carbon nanotube array-based biosensor [J]. Anal. Bioanal. Chem. 2003, 375, 103-110.
- 33.Karlsson, M.; Martensson, L. G., Adsorption of Human Carbonic Anhydrase II Variants to Silica Nanoparticles Occur Stepwise: Binding Is Followed by Successive Conformational Changes to a Molten-Globule-like State [J]. Langmuir 2000, 16, 8470-8479.
- 34. Tsang, S. C.; Davis, J. J.; Green, M.L.H.; Hill, H.A.O.; Leung, Y.C.; Sadler, P. J., Immobilization of small proteins in carbon nanotubes: high-resolution transmission electron microscopy study and catalytic activity [J]. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1995, 17, 1803-1804.
- 35. Davis, J.; Green, M. L. H.; Hill, H. A. O.; Leung, Y. C.; Sadler, P. J.; Sloan, J.; Xavier, A. V.; Tsang, S. C., The immobilisation of proteins in carbon nanotubes [J]. *Inorg. Chim. Acta* 1998, 272, 261-266.
- 36. Wong, S.; Joselevich, E.; Woolley, A. T.; Cheung, C. C.; Lieber, C.
 M., Covalently functionalized nanotubes as nanometresized probes in chemistry and biology [J]. Nature 1998, 394, 52-55.
- 37.Cui, Y.; Wei, Q. Q.; Park, H. K.; Lieber, C. M., Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biologicaland chemical species [J]. Science 2001, 293, (5533),

1289-1292.

- 38. Mattson, M. P.; Haddon, R. C.; Rao, A. M., Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth [J]. J. Mol. Neurosci. 2000, 14, 175-179.
- 39. Baughman, R. H.; Cui, C.; Zakhidov, A. A.; Iqbal, Z.; Barisci, J. N.; Spinks, G. M.; Wallace, G. G.; Mazzoldi, A.; De Rossi, D.; Rinzler, A. G.; Jaschinski, O.; Roth, S.; Kertesz, M., Carbon nanotube actuators [J]. Science 1999, 284, 1340-1344.
- 40.Kam, N. W. S.; O'Connell, M.; Wisdom, J. A.; Dai, H. J., Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction [J]. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2005, 102, (33), 11600-11605.
- 41.Lin, Y.; Taylor, S.; Li, H. P.; Fernando, K. A. S.; Qu, L. W.; Wang,
 W.; Gu, L. R.; Zhou, B.; Sun, Y. P., Advances toward bioapplications of carbon nanotubes [J]. J. Mater. Chem. 2004, 14, 527-541.
- 42.F. Balavoine, P. Schultz, C. Richard, V. Mallouh, T. W. Ebbesen and C. Mioskowski. Helical Crystallization of Proteins on Carbon Nanotubes: A First Step towards the Development of New Biosensors. Angew. Chem. Int. Ed., 1999, 38, 1912.
- 43.Boussaad, S.; Tao, N. J.; Zhang, R.; Hopson, T.; Nagahara, L. A., In situ detection of cytochrome c adsorption with single walled carbonnanotube device [J]. Chem. Commun., 2003, 13, 1502-1503.
- 44. Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H., Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization [J]. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, (16), 3838-3839.
- 45. Azamian, B. R.; Davis, J. J.; Coleman, K. S.; Bagshaw, C. B.;
 Green, M. L. H., Bioelectrochemical Single-Walled Carbon Nanotubes [J]. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, (43), 12664-12665.

- 46. Chen, R. J.; Bangsaruntip, S.; Drouvalakis, K. A.; Kim, N. W. S.; Shim, M.; Li, Y.; Kim, W.; Utz, P. J.; Dai, H., Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, (9), 4984-4989.
- 47. Shim, M.; Kam, N. W. S.; Chen, R. J.; Li, Y.; Dai, H., Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition [J]. Nano Lett. 2002, 2, (4), 285-288.
- 48. Sadana, A., Protein adsorption and inactivation on surfaces. Influence of heterogeneities [J]. Chem. Rev. 1992, 92, 1799-1818.
- 49.Kong, J.; Dai, H., Full and Modulated Chemical Gating of Individual Carbon Nanotubes by Organic Amine Compounds [J]. J. Phys. Chem. B. 2001, 105, 2890-2893.
- 50. Dhriti, N.; Kurt, E.G., pH-Sensitive Dispersion and Debundling of Single-Walled Carbon Nanotubes: Lysozyme as a Tool [J]. Small 2006, 2, 406-412.
- 51.Carolina, S. M.; Emmanuel, F.; Edith, S.; Jeremy, S.; Malcolm L.H., G; Robert B, S. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes [J]. Mol. Immuno. 2006, 43, 193-201.
- 52. Meng, J.; Song, L.; Xu, H.Y.; Kong, H.; Wang, C. Y.; Guo, X. T.; Xie, S.S. Effects of single-walled carbon nanotubes on the functions of plasma proteins and potentials in vascular prostheses [J]. Nanomed: Nanotech. Bio. Med. 2005, 1, 136-142.
- Wang, S.; Humphreys, E. S.; Chung, S. Y.; Delduco, D. F.; Lustig, S. R.; Wang, H.; Parker, K. N.; Rizzo, N. W.; Subramoney, S.; Chiang, Y. M.; Jagota, A., Peptides with selective affinity for carbon nanotubes [J]. Nat. Mater. 2003, 2, (3), 196-200.
- 54.Stryer, L.著, 唐有棋等译, 生物化学, 北京北京大学出版社, 1990,71, 9-72.
- 55.Karlsson, M.; Mårtensson, L. G.; Jonsson, B. H.; Carlsson, U.,

Adsorption of Human Carbonic Anhydrase II Variants to Silica Nanoparticles Occur Stepwise: Binding Is Followed by Successive Conformational Changes to a Molten-Globule-like State [J]. Langmuir 2000, 16, 8470-8479.

- 56.Karajanagi, S. S.; Vertegel, A. A.; Kane, R. S.; Dordick, J. S., Structure and Function of Enzymes Adsorbed onto Single-Walled Carbon Nanotubes [J]. Langmuir 2004, 20, 11594-11599.
- 57. Matsuura, K.; Saito, T.; Okazaki, T.; Ohshima, S.; Yumura, M.; Iijima, S., Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions [J]. Chem. Phys. Lett. 2006, 429, 497-502.
- 58.Su, Z.; Leung, T.; Honek, J. F., Conformational Selectivity of Peptides for Single-Walled Carbon Nanotubes [J]. J. Phys. Chem. B 2006, 110, (47), 23623-23627.
- Wang, S.; Humphreys, E. S.; Chung, S. Y.; Delduco, D. F.; Lustig, A. R.; Wang, H.; Parker, K. N.; Rizzo, N. W.; Subramoney, S.; Chiang, Y.-M.; Jagota, A. A., Preparation and Characterization of Silica Based Neutral Optical Density coatings by addition of Graphite Particles [J]. Nat. Mater. 2003, 2, 196-200.
- 60.Zorbas, V.; Ortiz-Acevedo, A.; Dalton, A. B.; Yosida, M. M.; Dieckmann, G. R.; Draper, R. K.; Baughman, R. H.; Jose-Yacaman, M.; Musselman, I. H., Preparation and Characterization of Individual Peptide-Wrapped Single-Walled Carbon Nanotubes [J]. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, (23), 7222-7227.
- 61.Sherwood, D.著, 范世藩译, 《晶体 X 射线和蛋白质》, 科学 出版社, 1985.
- 62. Greenfield, N. J.; Fasman, G. D., Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation [J]. *Biochemistry* 1969, 8, 4108-4116.
- 63. Wollmer, A.; Strassburger, W.; Glater, U., Perspectives in the

circular dichroic analysis of protein main-chain conformation Modern Methods in Protein Chemistry-ReviewArticles, Berlin& New York: Walter de Gruyter&Co.1, 83, 362-384.

- 64. Woody, R.W., Circular dichroism of peptides peptides 1985, 7, 15-114.
- 65.Kosen, P. A.; Creighton, T. E.; Blout, E. R., Circular dichroism spectroscopy of bovine pancreatic trypsin inhibitor and five altered conformational states [J]. *Biochem* 1981, 20, 5744-5760.
- 66. Greenfield, N. J.; Fasman, G. D., Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation [J]. *Biochem* **1969**, **8**, (10), 4108-4116.
- 67.郭尧君,荧光实验技术及其在分子生物学中的应用,北京:科学 出版社,1979,136-137.
- 68.Lloyd, J. B. F., Synchronized excitation of fluorescence emission spectra Nature, Phys. Sci. 1971, 231, 64-65.
- 69. Inman, E.L.; Winefordner, J.D., Constant energy synchronous fluorescence for analysis of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures [J]. Anal. Chem. 1982, 54, 2018-2023.
- 70. Byler, D. M.; Susi, H., Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra [J]. *Biopolymers* 1986, 25, 469-487.
- 71. Ataka, K.; Heberle, J., Functional Vibrational spectroscopy of a cytochrome c monolayer: SEIDAS probes the interaction with different surface-modified electrodes [J]. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 9445-9457.
- 72.朱自莹,顾仁敖,陆天虹,拉曼光谱在化学中的应用,东北大学出版社,1998年12月,第一版,206.
- 73.夏佑林,吴季辉,刘琴,施蕴渝,生物大分子多维核磁共振, 1999年6月第1版.
- 74. Murugesan, S.; Park, T.; Yang, H; Mousa, S.; Linhardt, R. J., Blood Compatible Carbon Nanotubes-Nano-based

Neoproteoglycans [J]. Langmuir 2006, 22, (8), 3461-3463.

- 75.Fu, K.; Huang, W.; Lin, Y., Functionalization of carbon nano tubes with bovine serum album in inhomogenous aqueous solution
 [J]. Nanosci Nanotechnol 2002, 2, 457-461.
- 76. Mattson, M. P.; Haddon, R. C.; Rao, A. M., Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth [J]. Mol Neuro sci 2000, 14, 175-182.
- 77. You, C.; Miranda, O. R.; Gider, B.; Ghosh, P. S.; Kim, I.; Erdogan, B.; Krovi, S. A.; Bunz, U. H. F.; Rotello V. M., Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose' sensors [J]. Nature Nanotechnology 2007, 2, 318-323.
- 78. You, C.; De, M.; Han, G.; Rotello, V. M. Tunable Inhibition and Denaturation of α-Chymotrypsin with Amino Acid-Functionalized Gold Nanoparticles [J]. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 12873-12881.
- 79.Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C., Light-directed spatially addressable parallel chemical synthesis [J]. Science 1991, 251, 767-773.
- 80.Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M., A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity [J]. Nature 1991, 354, 82-84.
- 81. Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E., Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery [J]. Nature 1991, 354, 84-86.
- 82.Dolle, R. E., Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity[C].Vol 2, Editors: Pavia MR, Moos WH, Kluwer Academic Publishers, 1999.93-124.
- 83. Peng, Z. G.; Hidajat, K.; Uddin, M. S., Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles [J]. J. Colloid Interface Sci. 2004, 271, 277-283.

- 84. Vertegel, A.; Siegel, R. W.; Dordick, J. S., Silica nanoparticles size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme [J]. Langmuir 2004, 20,6800-6807.
- Shang, W.; Nuffer, J. H; Dordick, J. S.; Siegel, R. W., Unfolding of Ribonuclease A on Silica Nanoparticle Surfaces [J]. Nano Lett. 2007, 7, (7), 1991-1995.
- 86.Lundqvist, M.; Sethson, I.; Jonsson, B. H., Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability [J]. Langmuir 2004, 20, 10639-10647.
- 87. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: Berlin, Germany, 2006.
- Eftink, M. R.; Ghiron, C. A., Fluorescence quenching studies with proteins [J]. Anal. Biochem. 1981, 114, 199-227.

致 谢

本论文是在我的导师司芝坤教授的悉心指导下完成的。司老师 以其精益求精的工作作风,诲人不倦的高尚师德,严以律己、宽以 待人的崇高风范,朴实无华、平易近人的人格魅力对我影响深远, 使我在做人、做事、做学问以及在专业知识、科研能力诸方面受益 匪浅。师恩似海,司老师的孜孜教诲让我受益终生,在此谨向司老 师致以衷心的感谢。

衷心感谢闫兵教授,闫教授对我的论文工作倾注了很多心血。 闫老师以他忘我的工作热情,严谨的科研态度,求实的治学精神, 活跃的思维方式,敏锐的洞察能力,给我树立了良好的学习榜样。 在此,我对闫老师的悉心指导和严格要求表示衷心的感谢。

感谢药学院张斌副教授、翟素梅老师、张秋老师对我实验工作 以及论文工作的指导和帮助。感谢董姝丽老师、曹照真老师田芳老 师以及陆玮洁老师在分析仪器使用上的指导和帮助。

感谢穆庆鑫、刘伟师姐、李振伟师妹、曲广波、祁铭华师姐、 刘爱风师妹、高素莲、高宁宁、张莹等同学在我实验和论文写作过 程中给予的支持和无私帮助。衷心感谢周宏钰师兄在实验材料合成 过程中的辛苦工作。同时感谢焦培福、王飞、王芳、时冉冉、李小 峰、于艳梅、孙颖、冯伟、马西凤等同学、师弟、师妹们在生活、 学习中给予的热情帮助。没有他们的帮助和支持是没有办法完成我 的硕士学位论文的,同窗之间的友谊永远长存。

感谢父母对我的养育之恩以及对我学业的支持,感谢家人在各 方面对我的关怀!

感谢所有关心、帮助我的老师和朋友!

邢月寒

2008年4月

山东大学

硕士期间发表论文

- Qingxin Mu, Wei Liu, Yuehan Xing, Hongyu Zhou, Zhenwei Li, Ying Zhang, Leihua Ji, Fang Wang, Zhikun Si, Bin Zhang, and Bing Yan Protein Binding by Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes Is Governed by the Surface Chemistry of Both Parties and the Nanotube Diameter. J. Phys. Chem. C 2008, 112, 3300-3307.
- Hongyu Zhou, Qingxin Mu, Ningning Gao, Aifeng Liu, Yuehan Xing, Sulian Gao, Qiu Zhang, Guangbo Qu, Yuyan Chen, Gang Liu, Bin Zhang, and Bing Yan A Nano-Combinatorial Library Strategy for the Discovery of Nanotubes with Reduced Protein-Binding, Cytotoxicity, and Immune Response. Nano Lett. 2008, 8, 859-865.