

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/63 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710055834.2

[43] 公开日 2008年1月30日

[11] 公开号 CN 101113457A

[22] 申请日 2007.7.4

[21] 申请号 200710055834.2

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 孙琳琳 王振新

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司

代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

[54] 发明名称

富精氨酸多肽 - 金纳米粒子细胞传输载体合成方法

[57] 摘要

本发明涉及富精氨酸多肽 - 金纳米载体的合成方法。本发明应用多肽表面修饰法：使用一种多肽稳定包裹金纳米粒子，第二种多肽实现纳米粒子的细胞跨膜传输功能。调节反应初始混合物中稳定多肽与传输多肽的比例，能获得不同传输能力的多肽 - 金纳米载体。该合成方法操作简单，所需时间短，合成出的金纳米粒子载体细胞跨膜传输效率高，检测方法简单直观。

1, 富精氨酸多肽-金纳米粒子细胞传输载体合成方法, 其特征在于, 步骤和条件如下:

首先, 按照 Frens-Turkevich 方法, 利用柠檬酸钠还原氯金酸, 制备出粒径为 30 nm 金纳米粒子;

使氨基酸序列为 CALNN 和 CALNNGRRRRRRRR(CALNNR₈)的多肽混合, 使两种多肽的摩尔浓度比例分别为 90%: 10%或 0%: 100%, 得到多肽混合物; 将该多肽混合物加入到粒径为 30 nm 金纳米溶液中, 使多肽的摩尔总浓度为 1-1.5 mM, 在室温下静置反应 1 h, 将溶液的 pH 值调节至 3-6, 使金纳米粒子在溶液中保持单分散, 离心 10000 rpm 后抛弃上清液, 然后加入与上清液等量的 pH 值为 3-6 的去离子水, 最后合成出了富精氨酸多肽-金纳米粒子细胞传输载体。

富精氨酸多肽-金纳米粒子细胞传输载体合成方法

技术领域

本发明涉及一种富精氨酸多肽-金纳米粒子细胞传输载体合成方法。

技术背景

无机纳米生物传输系统因其超小体积、特异的性质（如荧光、磁性、致密性）为活细胞内生化过程的获得及医用靶向药物治疗提供了新的媒介和技术手段（自然生物技术, *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 1013-1017）。其中生物分子和金纳米的杂交粒子又以其生物相容性、独特的光学性质可以对细胞进行实时、动态的观测，因此已有一些研究将DNA，蛋白、抗体、多聚物分子与金粒子相连接来实现跨细胞膜传输（科学, *Science*, 2006, 312, 1027-1030；生物聚合体化学, *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 482-490）。近几年多肽分子也被应用于功能化金纳米粒子，该方法可以使金纳米粒子在水溶液中保持高稳定性（美国化学会志, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 10076-10084），并实现高效率的跨膜传输（美国国家科学院院刊, *Proc. Natl. Acad. Sc. U. S. A.* 2006, 103, 1215-1220）。其中，多种从病毒跨膜蛋白提取的富精氨酸多肽不仅能够自动高效的跨膜，并且可将外源大分子传递进入细胞核（生物化学杂志, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 5836 – 5840；生物聚合体化学, *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 475 – 481）。然而，现有的利用肽链作为传递介质的金纳米载体的合成方法往往需要使用高聚物或蛋白来稳定金纳米粒子，再结合传递肽链，合成过程往往非常复杂，需要较长的反应时间，并且难以结合多种分子，实现多功能化。（美国化学会志, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 10076-10084；生物聚合体化学, *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 1176-1180）。

发明内容

本发明的目的是提供富精氨酸多肽-金纳米粒子细胞传输载体的合成方法。

多肽 CALNN 与金表面有很强的亲和性，能够形成致密的保护层，使金纳米粒子溶于水溶液，并可以保持长期的稳定性。CALNN 肽链 N 端的半胱氨酸能够以硫醇键与金表面形成牢固的共价键，疏水性的丙氨酸和亮氨酸能够促进多肽的自组装，在 C 端的两个天冬酰胺使多肽亲水。富精氨酸多肽 (CALNNR₈) 能够高效穿透细胞膜，并有针对性的聚集在细胞内特定位置。本发明结合这两种多肽的优势，优化合成条件，建立了富精氨酸多肽-金纳米粒子细胞传输载体的合成方法。

实现本发明的方法的具体的技术方案如下：

提供了一种富精氨酸多肽-金纳米粒子细胞传输载体合成方法。

首先，按照 Frens-Turkevich 方法，利用柠檬酸钠还原氯金酸，制备出粒径为 30 nm 金纳米粒子；

使氨基酸序列为 CALNN 和 CALNNGGRRRRRRRR(CALNNR₈)的多肽混合，使两种多肽的摩尔浓度比例分别为 90%：10%或 0%：100%，得到多肽混合物；将该多肽混合物加入到粒径为 30 nm 金纳米溶液中，使多肽的摩尔总浓度为 1-1.5 mM，在室温下静置反应 1 h，将溶液的 pH 值调节至 3-6，使金纳米粒子在溶液中保持单分散，离心 10000 rpm 后抛弃上清液，然后加入与上清液等量的 pH 值为 3-6 的去离子水，最后合成出了富精氨酸多肽-金纳米粒子细胞传输载体。

将培养好的细胞离心 1000 rpm, 5 min 富集，用 0.1 M 磷酸缓冲溶液 (PBS) 清洗，离心 1000 rpm, 5 min 富集，去除上清液，将 1 ml, 0.32 nM 多肽-金纳米粒子溶液与 1×10^4 个细胞混合均匀反应 2 h，加入与金纳米溶液等量 pH 值相同的培养基，在 5% CO₂, 37°C 环境下培养 24 小时。通过光学显微镜及暗场显微镜观察，共培养 12 小时后金纳米粒子集中在细胞的特定位置，该位置呈现红色，24 小时后由于大量粒

子的聚集，靶标位置呈现红黑色，细胞其它部位呈现淡红色。

本发明的有益效果明显：

(1)、本发明应用多肽表面修饰法：使用一种多肽稳定包裹金纳米粒子，第二种多肽实现纳米粒子的细胞跨膜传输功能。调节反应初始混合物中稳定多肽与传输多肽的比例，能获得不同传输能力的富精氨酸多肽多肽-金纳米载体。

利用多肽 CALNN 稳定金纳米粒子，CALNN 肽链 N 端的半胱氨酸能够以硫醇键与金表面形成牢固的共价键，丙氨酸和亮氨酸能够促进多肽的自组装，在 C 端的两个天冬酰胺使多肽亲水。在 CALNNGRRRRRRRR(CALNNR₈)中 R₈ 作为驱动序列，能够跨越细胞膜将金粒子传递到细胞内部。合成总时间小于两小时，两种多肽能够在一步反应中与金纳米粒子表面结合。反应在室温下进行，条件温和，无需特殊设备的辅助。该合成方法操作简单，所需时间短。合成出的金纳米粒子载体细胞跨膜传输效率高，检测方法简单直观。

(2)、载体传输效率高。富精氨酸多肽利用多肽表面正电荷与带负电荷的细胞膜相吸附，启动细胞内吞作用，几分钟内即可完成穿膜过程。传输定位准确，多肽-金纳米粒子可传输到细胞核或内质网的位置，并在该位置富集，使其呈现红色。随着传递时间的增加，靶向位置由于金粒子的聚积显现黑红色，其他位置为淡红色。合成出的金纳米粒子载体细胞跨膜传输效率高。

(3)、检测简单直观。相比较细胞载体传统检测手段——电子显微镜，荧光显微镜等，该载体的传输功能可由普通光学显微镜观察。样品不需其他预处理，载体在细胞内的传递位置可根据颜色判断：细胞核或内质网结构显现红色，明显区别于其他位置。检测时间短，每个小时可以检测上百个样品。金纳米粒子的显色性稳定，不会淬灭的性质可使检测样品长时间保存。检测方法简单直观。

附图说明

图 1 是本发明中制备的金纳米粒子的透射电镜图。金纳米粒子的平均粒径是 30 ± 3 nm。

图 2 是金纳米粒子的紫外可见吸收光谱图。其中, a 线是柠檬酸钠法合成的 30 nm 金纳米粒子的紫外可见吸收光谱; b 线是富精氨酸多肽-金纳米粒子在 pH 5.5 的紫外可见吸收光谱。

图 3 是富精氨酸多肽-金纳米粒子进入细胞的明场显微镜照片。(a) 与富精氨酸多肽-金纳米粒子共培养 24 小时后, 大部分细胞核呈现黑红色, 细胞质呈现淡红色; (b) 一部分金纳米粒子未能进入细胞核, 而集中在细胞质内; (c) 对照组——只用 CALNN 多肽包裹的金纳米粒子与细胞共培养 24 小时后, 细胞保持透明。

图 4 (a) 是富精氨酸多肽-金纳米粒子进入细胞的明场显微镜照片; (b) 是相对应的暗场显微镜照片。

图 5 HeLa 细胞与不同浓度的富精氨酸多肽-金纳米粒子共培养 24 小时后的活率。

具体实施方式

实施例 1

提供了一种富精氨酸多肽多肽-金纳米粒子细胞传输载体合成方法。首先, 按照 Frens-Turkevich 方法, 利用柠檬酸钠还原氯金酸制备出粒径为 30 nm 金纳米粒子; 使氨基酸序列为 CALNN 和 CALNNGGRRRRRRRR(CALNNR₉)的多肽混合, 使两种多肽的摩尔浓度比例为 90%: 10%, 得到多肽混合物; 将多肽混合物加入到粒径为 30 nm 金纳米溶液中, 使多肽的摩尔总浓度为 1 mM, 在室温下静置反应 1 h, 将溶液的 pH 值调节至 3, 使金纳米粒子在溶液中保持单分散, 离心 10000 rpm 后抛弃上清液, 然后加入与上清液等量的 pH 值为 3 的去离子水, 最后合成出了富精氨酸多肽-金纳米

粒子细胞传输载体。

将培养好的细胞离心 1000 rpm, 5 min 富集, 用 0.1 M 磷酸缓冲溶液 (PBS) 清洗, 离心 1000 rpm, 5 min 富集, 去除上清液, 将 1 ml, 0.32 nM 多肽-金纳米粒子溶液与 1×10^4 个细胞混合均匀反应 2 h, 加入与金纳米溶液等量 pH 值相同的培养基, 在 5% CO₂, 37°C 环境下培养 24 小时。通过光学显微镜及暗场显微镜观察, 共培养 12 小时后金纳米粒子集中在细胞的特定位置, 该位置呈现红色, 24 小时后由于大量粒子的聚集, 靶标位置呈现红黑色, 细胞其它部位呈现淡红色。

实施例 2

使多肽 CALNN 和 CALNNGRRRRRRRR(CALNNR₉)摩尔浓度比例为 0%:100%。

其他步骤同实施例 1

实施例 3

使多肽与金纳米溶液在室温下静置反应 1 h, 将溶液的 pH 值调节至 6, 使金纳米粒子在溶液中保持单分散, 离心 10000 rpm 后抛弃上清液, 然后加入与上清液等量的 pH 值为 6 的去离子水。其他步骤同实施例 1

实施例 4

使多肽在金纳米溶液中的浓度为 1.5 mM, 在室温下静置反应 1 h。其他步骤同实施例 1。

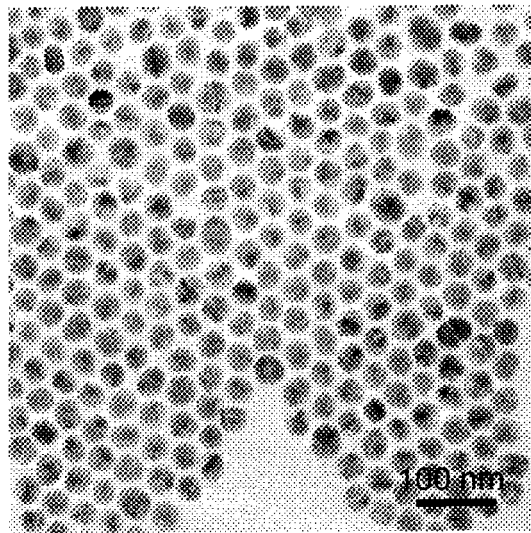


图 1

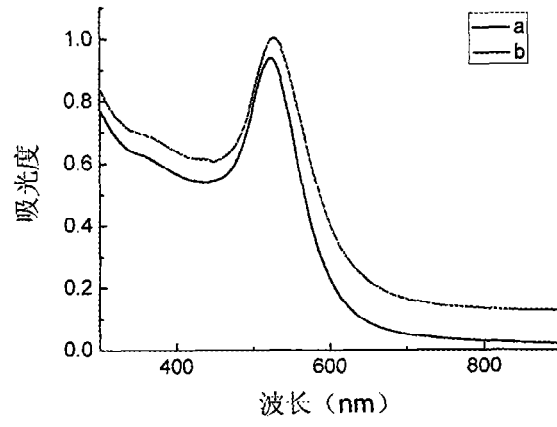


图 2

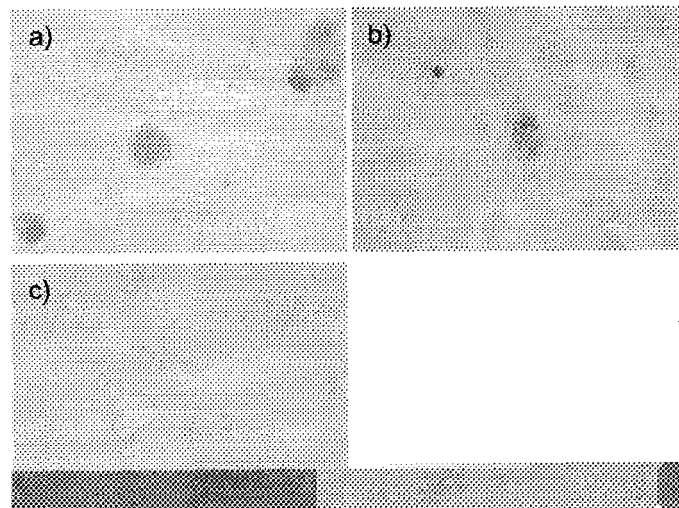


图 3

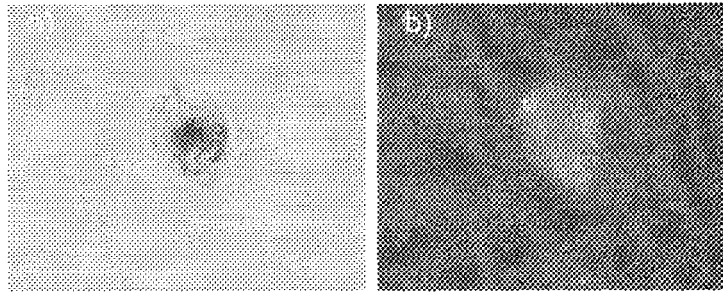


图 4

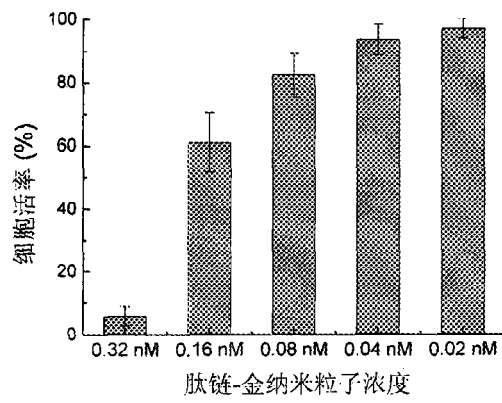


图 5