

阳离子寡肽序列的合成及生物学研究 ——推荐一个针对化学生物学专业学生的研究型实验

孙云霞* 张先正

(武汉大学化学与分子科学学院, 生物医用高分子材料教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 采用多肽固相合成技术制备了寡肽序列 RRRRRRRR(R_8)。通过电喷雾电离质谱仪对序列的相对分子质量进行了表征。进一步通过琼脂糖凝胶电泳和细胞内吞实验考察寡肽序列在生物学研究方面的应用。本实验可以加深学生对有机化学、高分子化学及生物化学的理解与运用, 培养学生分析问题和解决问题的综合能力。

关键词: 氨基酸; 寡肽; 多肽; 凝胶电泳

中图分类号: O6-33; G64

Synthesis and Biological Research of Polycationic Oligopeptide: A Research-Based Experiment Recommended for Chemical Biology Majoring Students

SUN Yun-Xia* ZHANG Xian-Zheng

(Key Laboratory of Biomedical Polymers of Ministry of Education & Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072, P. R. China)

Abstract: The oligopeptide R_8 was synthesized through the solid phase peptide synthesis (SPPS) protocols, and the molecular weight was measured by MS-ESI. The biological application of R_8 was investigated by agarose gel electrophoresis assay and endocytosis. Through this experiment, students can study and apply organic chemistry, polymer chemistry, and chemical biology, as well as develop their capability for analyzing and resolving problems.

Key Words: Amino acid; Oligopeptide; Peptide; Gel electrophoresis

寡肽是由十种以下具有不同物理和化学性质的天然氨基酸通过肽键组成, 由十种以上一百种以下氨基酸组成的称为多肽^[1]。寡(多)肽由于其特有的生物活性、生物可降解性和良好的生物相容性而引起生物医学应用研究的广泛关注, 尤其在基因传递、组织工程及细胞培养等方面。由于天然氨基酸分别具有不同的理化性质, 通过调节寡(多)肽的序列, 可制备出具有不同生理活性和生物功能的寡(多)肽^[2]。本实验通过多肽固相合成技术合成了阳离子寡肽序列, 并初步研究了其作为基因传递系统的基本条件。

*通讯作者, Email: yx-sun@whu.edu.cn

基金资助: 国家自然科学基金项目(21004046, 51473126)

基因传递系统又称为基因载体,是可以携带DNA进入细胞的材料。传统的基因载体主要是病毒载体。由于病毒载体携带的DNA大小有限,而且病毒载体能引起免疫原性反应、致癌性以及能任意地整合到主体的基因组当中,存在着很大的安全隐患^[3,4]。与病毒载体相对应的非病毒基因载体无传染性,安全隐患较小,而且成本较低,可以大量制备,重现性也较好。非病毒载体一般包括裸DNA、脂质体、阳离子高分子聚合物,其中脂质体又分为阳离子、阴离子及中性脂质体。阳离子脂类通过静电作用与DNA形成脂质体/DNA复合物(lipoplex)。常用的阳离子高分子聚合物包括天然高分子聚合物和合成高分子聚合物,天然高分子聚合物主要有壳聚糖及其衍生物^[5,6],合成聚合物主要有聚赖氨酸^[7,8]、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)^[9,10]、树形高分子(dendrimer)等^[11]。脂质体和阳离子高分子非病毒载体也存在着一些缺点,例如,缺乏靶向特异性、转染效率低、毒性较高、血清存在时不稳定等^[12],直接限制了它们在临床的应用。为了克服传统非病毒基因载体的缺点,本文利用天然氨基酸的优点制备了具有细胞穿膜功能的寡肽序列R₈。

本实验针对化学系大学四年级化学生物学专业的学生开设,化学生物学专业共有学生约18人,以每三个学生为一组协作进行实验。该实验融合了基础有机化学、仪器分析化学以及生物学等知识,作为本科生综合实验,可以使学生较早地接触前沿科学,了解化学专业不再是一个单调、乏味的学科,而是一个与生物、物理、材料等学科交叉的前沿性学科,是一个很有发展前景的学科。

1 实验目的

- (1) 掌握多肽固相合成技术的原理和操作方法。
- (2) 熟悉电喷雾电离质谱仪(ESI-MS)的操作方法。
- (3) 了解凝胶电泳的一般原理并掌握凝胶电泳等基本生物实验操作。

2 实验原理

寡(多)肽是不同氨基酸从C端(羧基端)向N端(氨基端)直接通过肽键连接而成。过去的寡(多)肽合成一般是在溶液中进行的,称为液相合成法。为了提高产品的纯度和降低合成难度,发展了固相合成技术。固相合成是在密闭的防爆玻璃反应器中使氨基酸按照已知顺序(序列,一般从C端-羧基端向N端-氨基端)不断添加、反应、合成,最终得到寡(多)肽^[13],多肽合成的流程图如图1所示。本实验采用固相合成技术合成了细胞穿膜肽R₈,利用电喷雾电离质谱仪对产物结构进行了鉴定,并通过凝胶电泳实验考察了R₈作为基因载体的基本条件。

在阳离子寡(多)肽中,氨基基团的正电荷与DNA的磷酸根基团的负电荷通过静电吸附作用而发生电性中和,与DNA自组装成稳定的复合物(complexes),使DNA不易被核酸酶降解。R₈与DNA形成的复合物主要通过非特异性的细胞内吞方式进入细胞,包括网格蛋白介导性内吞(clathrin-mediated endocytosis)、细胞膜穴样内陷(caveolae-mediated endocytosis)、大分子胞饮内吞(macropinocytosis)等^[14,15]。R₈与DNA复合物进入细胞后形成内涵体,复合物从内涵体中快速逃逸进入细胞质,进而扩散进入细胞核进行基因表达。

3 实验仪器及药品

3.1 药品

氨基以及侧基的胍基分别被9-苄甲氧羰基和2,2,4,6,7-五甲基-2H-苯并咪唑-5-磺酰基保护的精氨酸(Fmoc-Arg(Pbf)-OH)、苯并三氮唑-*N,N,N'*-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)以及2-氯-三苯甲基氯树脂(2-chlorotrityl chloride resin, 100–200目,负载量: $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)、哌啶(piperidine)、三氟乙酸(TFA)、1,2-乙二硫醇(EDT)、吗啡啉、茚三酮,分析纯。二异丙基乙胺(DIEA)、*N,N*-二甲基甲酰胺

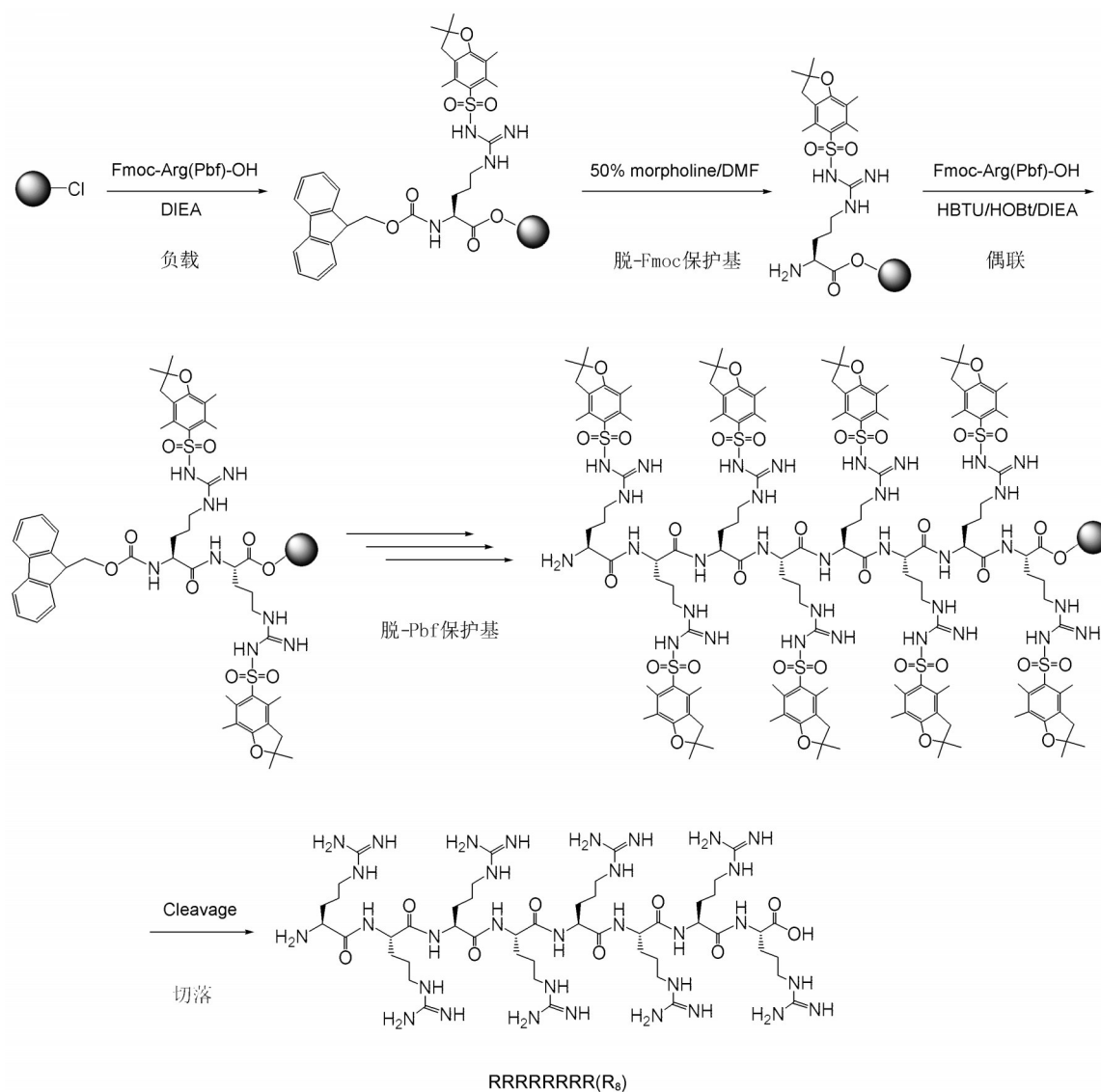


图1 多肽固相合成流程图

(DMF)、二氯甲烷, 化学纯。荧光素酶质粒 pGL-3 DNA 在 *E. Coli* JM109 大肠杆菌中扩增, 质粒的提取和纯化使用 Qiagen endotoxin-free plasmid Gigaprep 试剂盒, 通过去内毒素质粒纯化过程完成。人源宫颈癌细胞(HeLa)购于中国典型培养物保藏中心(武汉)。DMEM 细胞培养基干粉、胰蛋白酶、胎牛血清购于 Gibco。

3.2 仪器

多肽合成玻璃柱, 电喷雾电离质谱仪(ESI-MS), 琼脂糖凝胶电泳仪, 电泳成像仪, 细胞培养箱, 生物安全柜, 激光共聚焦显微镜。

4 实验过程

4.1 多肽序列的合成及表征

(1) 参考文献方法^[16,17], 称取 1.5 g 2-氯-三苯甲基氯树脂(负载量: 1.2 mmol·g⁻¹)至多肽合成装置,

加入 10 mL 干燥的 DMF 浸泡树脂数小时，使之充分溶胀，最后排出溶剂 DMF。

(2) 称取 2.34 g(3.6 mmol) Fmoc-Arg(Pbf)-OH 于称量瓶中，用 10 mL DMF 将其溶解，然后将该溶液转入到上步含有处理过的树脂的多肽合成装置中，再加入 3.3 mL 催化剂二异丙基乙胺(DIEA)，室温下让 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 与树脂相互作用约 1.5 h，使其充分固定在树脂上。

(3) 用 4×10 mL DMF 洗涤树脂。

(4) 加入 13 mL 50%吗啡啉/DMF(体积比)溶液到上一步的树脂中，反应 2 h，脱去 Arg 上的 Fmoc 保护基。

(5) 用 4×10 mL DMF 洗涤树脂，用茚三酮检验脱保护是否完全。

(6) 称取 2.34 g(3.6 mmol) Fmoc-Arg(Pbf)-OH，1.8 g(4.752 mmol) HBTU，0.64 g(4.752 mmol) HOBt 于称量瓶中，用 10 mL DMF 溶解，将该溶液转入到上步处理后的多肽合成装置中，再加入 2 mL DIEA，缩合反应 1.5 h。

(7) 用 4×10 mL DMF 洗涤树脂。

(8) 加入 13 mL 50%吗啡啉/DMF(体积比)溶液到树脂中，反应 2 h，脱去 Asp 上的 Fmoc 保护基。

(9) 用 4×10 mL DMF 洗涤树脂，用茚三酮检验脱保护是否完全。

(10) 依次分别称取 6 次等量 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 2.34 g(3.6 mmol)，分别重复步骤 6–9。

(11) 用 4×10 mL CH_2Cl_2 洗涤树脂，充分洗干，于真空干燥箱中干燥 24 h。

(12) 脱侧基保护基(Pbf)，切落多肽：将 25 mL TFA，0.6 mL 乙二硫醇，2 mL 苯酚，1.3 mL H_2O ，1.3 mL TIS，1.3 mL 苯甲硫醚的混合液加到干燥后的树脂中，反应 2 h。

(13) 收集滤液 TFA，用少量 TFA 洗树脂，收集洗液，合并滤液和洗液，用适量的无水乙醚进行沉淀，静置。沉淀充分后，抽滤，洗涤，干燥，得产品 R_8 ，用电喷雾电离质谱仪(ESI-MS)检测多肽的相对分子质量。ESI-MS 检测的单电荷分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1268.5$ ，计算得到的相对分子质量与理论分子质量($M = 1267.5$)相吻合。寡肽序列的 ESI-MS 图谱如图 2 所示。

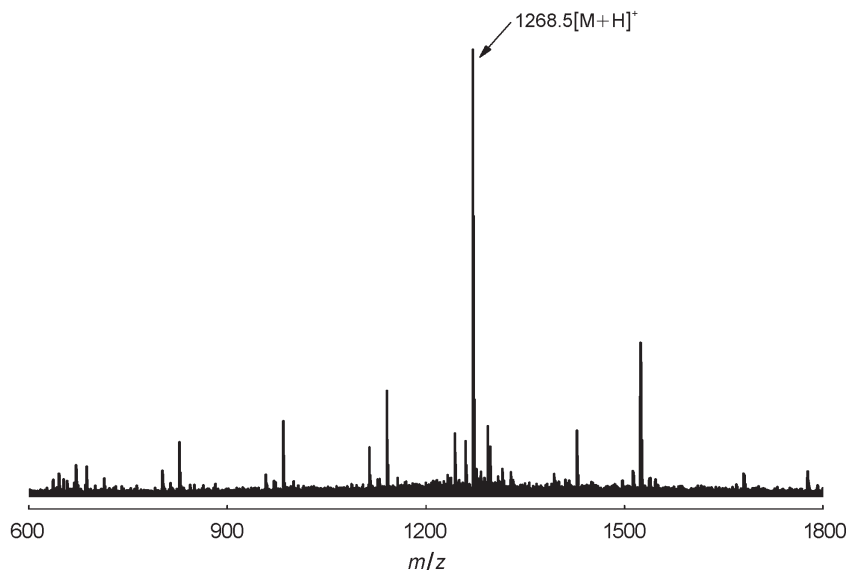


图2 R_8 寡肽序列 ESI-MS 图谱

4.2 生物学研究

4.2.1 琼脂糖凝胶的制备

(1) 分别称取 140 mg 琼脂糖干粉、量取 400 μL 的 TAE(Tris-醋酸)缓冲溶液和 2 μL 的 GelRed™ 染

料, 置入 50 mL 的锥形瓶中, 加入 20 mL 的去离子水。然后将锥形瓶放入微波炉加热至琼脂糖完全溶解。

(2) 待溶液冷却至 65 °C 后, 倒入制胶板中冷却静置 30 分钟。

(3) 待胶完全凝固好后加入电泳槽中备用。

4.2.2 R_s /DNA 复合物的制备

称一定量的 R_s 粉末溶在 150 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液中配成 0.4 mg·mL⁻¹ 的溶液, 用 220 nm 的滤膜过滤灭菌。量取 1.0 μL DNA 的 TE 溶液(100 ng·μL⁻¹)加入 0.5 mL 的无菌离心管中, 按照不同的 N/P 比(R_s 上胺基的物质的量与 DNA 上磷酸根的物质的量之比)加入不同体积的 R_s 溶液与 DNA 混合, 最后补加一定体积的 150 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液使总体积达到 10.0 μL。将 10.0 μL 的混合液震荡 5 s 后在 37 °C 下静置 30 min 后备用。

4.2.3 凝胶电泳实验

在 37 °C 下静置 30 min 后, 在复合物中加入 1.0 μL 溴酚蓝溶液。随后将 N/P 比分别为 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 的 R_s /DNA 复合物加入含 2.0 μL GelRed™ 染料的 0.7% (g·mL⁻¹) 的琼脂糖凝胶中进行电泳实验。电泳在 80 V 电压下的 Tris 的醋酸溶液中进行 80 min, 然后在凝胶成像仪(vilber lourmat)下通过紫外照射成像观察。

阳离子对 DNA 的络合能力是考察其作为载体的一个首要条件。阳离子载体与 DNA 通过静电作用形成紧密络合体, 络合体在进入细胞后可避免被细胞内的酶降解, 从而可以顺利地由内涵体逃逸到细胞质再进入细胞核内进行表达^[18]。由图 3 可看出, R_s /DNA 复合物在 N/P 比为 6 时, DNA 被完全络合。

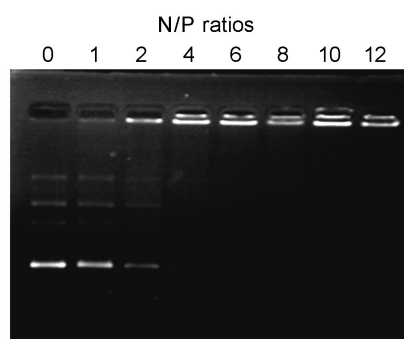


图3 R_s 与DNA形成复合物的琼脂糖凝胶电泳结果

4.2.4 复合物跨细胞膜实验

在复合物跨膜实验中, 用绿色荧光探针 YoYo-1 标记 DNA, 用蓝色荧光探针 Hoechst 33258 标记细胞核。HeLa 细胞以 1×10^5 个/孔的密度种到 25 mm 直径的培养皿中, 在培养箱中培养 24 h。随后, 吸弃旧培养基, 加入 R_s /DNA 复合物(N/P 比为 10), 在培养箱内共同培养 4 h。然后吸弃含复合物的旧培养基, 用 1 mL PBS 淋洗细胞三次。将 20 μL Hoechst 33258(10 μg·μL⁻¹)加入 200 μL DMEM, 混匀后加入培养皿中, 在培养箱内孵育 20 min。20 min 后弃去皿内液体, 用 1 mL PBS 淋洗细胞三次, 加入 1 mL 新鲜的 DMEM(含 10% FBS)。将培养皿放在激光共聚焦显微镜下观察并拍照(波长为 488 nm 和 405 nm, 放大倍数为 40×)。复合物 4 h 后部分跨过细胞膜进入细胞质, 部分分布在细胞核周围。共聚焦显微镜拍摄的复合物跨膜结果如图 4 所示。

5 实验安排及建议

(1) 本实验需要的时间为 24 课时, 分 3 天完成, 其中 R_s 序列的合成需要 16 课时连续两天完成, R_s

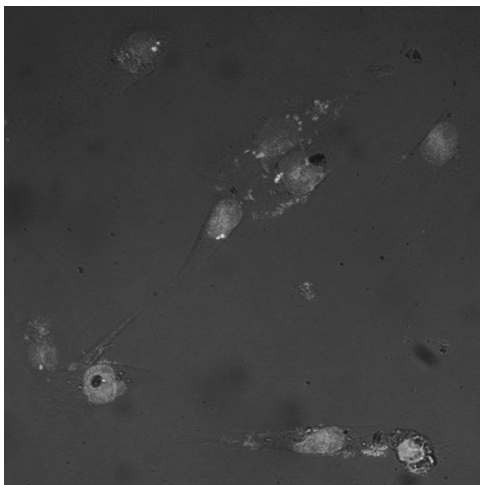


图4 R₈/DNA复合物跨膜过程

序列的结构、相对分子质量表征以及凝胶电泳实验需要8课时一天内完成，建议将本实验作为学生的综合实验进行。

(2) 考虑到细胞培养及操作实验需要无菌条件，建议将R₈/DNA复合物跨膜的细胞内吞实验作为学生的业余科研内容，对复合物跨膜过程感兴趣的学生可以到教师的研究课题组中进行实验。

(3) 实验前需要学生查阅多肽合成及细胞生物学等相关知识。要求学生学习巩固大学三年级学习的电喷雾电离质谱、凝胶电泳成像仪的操作。

(4) 实验针对大学四年级化学生物学专业学生开设，实验人数共18人，每3个人一组，分6组进行实验。要求组内成员合理分工，协作完成实验。

(5) 实验完成后，实验报告以研究性论文格式提交，要求对实验结果进行讨论和总结。

6 思考题

- (1) 多肽固相合成的基本原理是什么？
- (2) 氨基酸、多肽及蛋白质的区别？
- (3) 多肽固相合成过程中茚三铜的作用是什么？

7 实验注意事项

- (1) 寡肽合成所用的DMF要先加无水硫酸镁干燥，过滤后减压蒸馏，收集备用。
- (2) 凝胶电泳实验中使用GelRed™染料时注意不能接触到口、鼻和皮肤，做好的凝胶不能直接用手接触，要带医用手套操作。
- (3) 实验完毕后清洗寡肽合成的玻璃柱。
- (4) 细胞实验要在生物安全柜中进行，实验前要带医用手套，穿干净实验服。所有从外面放入生物安全柜的用品要喷医用酒精消毒。应避免YoYo-1和Hoechst 33258荧光染料接触皮肤。

8 实验特色和效果

本实验综合基础有机化学、高分子化学、材料化学、生物化学及仪器分析等实验的原理和操作方法，是集合成与表征为一体的综合性较强的实验。该实验的设计综合考虑了实验教学和科学研究的特点，将两者紧密结合起来，可以增进实验教学与科学研究的联系。通过本实验，不仅可以使学生掌握

多肽序列的合成方法, 加深对基础实验原理和实验操作的理解, 还可以培养学生在较高层次上了解多肽序列的特殊应用, 有利于扩宽学生的知识面, 培养学生的实践能力和创新能力。

参 考 文 献

- [1] 李世成, 杨则宜. 中国运动医学杂志, **2003**, No. 2, 174.
- [2] Ganapathy, V.; Leibach, F. H. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258 (23), 14189.
- [3] Mahato, R. I. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2005**, 57, 699.
- [4] Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 259.
- [5] Du, L. B.; Gao, Y. L.; Yang, H.; Li, Y. C.; Zhuang, Q. F.; Jia, H. Y.; Nie, G. J.; Liu, Y. *RSC Adv.* **2013**, 3 (34), 14791.
- [6] Layek, B.; Singh, J. *Biomacromolecules* **2013**, 14, 485.
- [7] Zhou, D. Z.; Li, C. X.; Hu, Y. L.; Zhou, H.; Chen, J. T.; Zhang, Z. P.; Guo, T. Y. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4594.
- [8] Cai, X. J.; Li, Y. Y.; Yue, D.; Yi, Q. Y.; Li, S.; Shi, D. L.; Gu, Z. W. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3 (8), 1507.
- [9] Yamada, H.; Loretz, B.; Lehr, C. M. *Biomacromolecules* **2014**, 15 (5), 1753.
- [10] Bao, X. L.; Wang, W.; Wang, C.; Wang, Y.; Zhou, J. P.; Ding, Y.; Wang, X. Y.; Jin, Y. T. *Biomaterials* **2014**, 35 (29), 8450.
- [11] Lee, J.; Jung, J.; Kim, Y. J.; Lee, E.; Choi, J. S. *Int. J. Pharmaceut.* **2014**, 459 (1–2), 10.
- [12] Kircheis, R.; Wightman, L.; Wagner, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 53, 341.
- [13] 王昱佳, 刘欣宇, 陈永湘. 大学化学, **2014**, 29 (2), 54.
- [14] Lehto, T.; Simonson, O. E.; Mäger, I.; Ezzat, K.; Sork, H.; Copolovici, D. M.; Viola, J. R.; Zaghoul, E. M.; Lundin, P.; Moreno, P. M. D.; Mäe, M.; Oskolkov, N.; Suhorutšenko, J.; Smith, C. I.; Andaloussi, S. E. L. *Mol. Ther.* **2011**, 19 (8), 1457.
- [15] Tiwari, P. M.; Eroglu, E.; Bawage, S. S. *Biomaterials* **2014**, 35, 9484.
- [16] Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35 (3), 161.
- [17] Moore, N. M.; Barbour, T. R.; Sakiyama-Elbert, S. E. *Mol. Pharm.* **2008**, 5 (1), 140.
- [18] Park, T. G.; Jeong, J. H.; Kim, S. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, 58, 467.