



亲水氨基酸对类 Bola 型短肽自组装行为的影响*

高欣欣 韩 雨 周依琳 陈西雅 赵玉荣**

(中国石油大学(华东)化学化工学院, 青岛 266580)

摘要 **目的** 类 Bola 型短肽在 C 端间氢键的作用下可形成肽二聚体, 从而展现出新颖的自组装特性。为探索亲水氨基酸种类对类 Bola 型短肽自组装行为的影响, 本文以 Ac-KI₃-CONH₂ 为模板, 通过将亲水性的残基赖氨酸 (K) 分别替换为精氨酸 (R) 或组氨酸 (H), 设计合成了短肽 Ac-RI₃-CONH₂ 和 Ac-HI₃-CONH₂, 系统研究了它们的自组装行为。**方法** 利用原子力显微镜和透射电子显微镜表征了组装体的形貌和尺寸, 通过圆二色光谱术和傅里叶变换红外光谱术探索了组装体的二级结构, 借助小角中子散射获取了组装体的内部结构信息。在此基础上, 系统分析了亲水氨基酸种类对类 Bola 型短肽自组装行为的影响, 阐明了组装体的形成机制。**结果** 研究表明, Ac-KI₃-CONH₂ 和 Ac-RI₃-CONH₂ 均可自组装形成直径较大的双层纳米管, 宽度约为 200 nm。这些纳米管是由扭转 (twist) 带转变为螺旋 (helical) 带, 并进一步发生边缘融合形成的。然而, 它们的初级组装体纤维的手性相反, Ac-KI₃-CONH₂ 为左手螺旋, 而 Ac-RI₃-CONH₂ 为右手螺旋, 这主要是 K 和 R 残基与水形成氢键的能力不同导致的。Ac-HI₃-CONH₂ 则形成了扭转带结构, 由于咪唑环间较大的位阻作用, 带宽度显著减小, 约为 30 nm。同时, 咪唑环既可以作为氢的供体, 又可以作为氢的受体, 促进了组装体在高度方向的生长, 导致形成的带具有多层高度。**结论** 短肽组装体的形成是不同非共价键力共同作用的结果, 通过改变类 Bola 型短肽中亲水氨基酸残基的种类, 有效调控了促进组装体形成的非共价键力的相对强弱, 进而控制了组装体的形貌和手性。本研究为不同组装体的构筑提供了简便有效的途径, 也为功能性生物材料的开发提供了理论依据。

关键词 肽, 组装体, 非共价键力, 亲水氨基酸**中图分类号** O647/Q67**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0502**CSTR:** 32369.14.pibb.20240502

在生命活动中, 蛋白质的作用至关重要, 几乎参与生命活动的所有过程, 其结构的异常变化会导致很多重大疾病产生^[1-2], 例如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病及 2 型糖尿病等^[3-4]。研究发现, 阿尔茨海默病的产生主要是由含 39~43 个氨基酸残基的多肽链自组装导致的, 它们能自发聚集形成细长的纤维, 纤维在细胞内不断聚集成 β 淀粉样蛋白并进一步沉积, 从而引发疾病^[5-6]。蛋白质结构复杂, 难以修饰, 这在一定程度上阻碍了对自组装途径和组装过程的探索。多肽是介于氨基酸和蛋白质之间的小分子物质, 简单的和短的线性肽已经被设计和选择以自组装成不同的纳米结构^[7-8]。与天然蛋白质结构类似, 多肽自组装是一个分级过程, 是多肽分子在一系列非共价键力的协同作用下, 自下而上形成有序组装体的过程^[9]。肽组装体的形成受到生物分子自身结构和外部环境刺激的

控制。所谓调控短肽分子的组装, 实际上就是调控分子间各种非共价相互作用, 包括静电相互作用、氢键、π-π 堆积作用以及空间效应等来达到精确控制自组装肽的有序超分子结构的目的^[10], 以获得囊泡、胶束、纳米纤维和纳米管等不同组装结构的过程^[9, 11]。在各种自组装结构中, 由多肽自组装形成的纤维和管等结构在生物体内发挥重要的生物学功能, 因此备受关注^[12-14]。

在研究中人们发现, 氨基酸的种类、构型和排列顺序以及溶剂的种类、温度和 pH 值等常对自组装材料的最终形态产生很大影响^[15-19]。Sangji 等^[20]研究发现, 通过将多肽序列中丙氨酸 (A) 逐步替换为缬氨酸 (V), 可以使得纳米纤维的手

* 国家重点研发计划 (2023YFC2811003) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0532-86981562, E-mail: yurongzhao@upc.edu.cn

收稿日期: 2024-12-04, 接受日期: 2025-02-13

性从左旋转为右旋, 并且此过程中伴随着组装体螺距与宽度的显著变化。Xing等^[21]研究发现, 当Fmoc-FWH三肽中间的色氨酸(W)被苯丙氨酸(F)取代时, 组装体由左旋纤维变为高度均匀的右旋纤维。本课题组成功展示了如何通过改变疏水侧链的几何结构和核心疏水残基的个数来调节肽纳米管的外径和内径。这种基于分子设计的精细调控方法, 为自组装纳米结构的可预测性及模板化提供了新的思路^[22]。上述研究表明, 肽序列的疏水侧链之间的相互作用是影响其堆积模式的关键因素, 通过调节这些相互作用, 可以实现对组装体形貌、尺寸和手性等的有效调控。

相比于容易引起肽和蛋白质聚集的疏水性氨基酸残基, 亲水性氨基酸残基, 如精氨酸(R)、赖氨酸(K)和组氨酸(H), 可促进多肽在水中的溶解^[23], 并在组装体形成后分布于其表面^[24]。同时, 亲水氨基酸因其多阳离子性、良好的水溶性和生物相容性等而表现出优异的抗菌性能^[25-26]。研究表明, 通过将短肽中疏水氨基酸替换为亲水氨基酸, 可有效降低短肽运输载体的溶血毒性和细胞毒性^[27]。富含碱性残基的阳离子肽, 非常适合作为细胞穿透肽与DNA等阴离子物质进行非共价相互作用来完成细胞内递送^[28-29]。正因如此, 研究亲水氨基酸残基对多肽自组装行为的影响不仅有助于构筑不同的组装体调控方法, 还可促进形成的组装体在不同领域的应用。崔洪刚课题组^[30]研究发现: 通过调节不同亲水氨基酸末端电荷的静电排斥作用可改变 β 片层(β -sheet)的扭曲度, 构筑形貌不同的组装体, 如纤维、平带和螺旋带结构等; 通过相反电荷的肽共组装或设计合成同时含酸性和碱性氨基酸的肽, 可有效降低静电斥力, 促进较宽的平带结构形成。这些工作表明, 通过改变亲水氨基酸残基的种类, 可以有效调控多肽的自组装行为并实现其功能化, 这对新材料的开发具有重要意义。

本课题组前期设计合成了Bola型短肽Ac-KI₄K-CONH₂, 两个质子化赖氨酸残基分别位于两个末端, 沿着 β 折叠(β -strand)对称。短肽分子在骨架间氢键作用的驱动下首先形成 β 片层, 氨基酸侧链分布在片层两侧。这些片层结构在侧链间疏水作用的驱动下发生侧向堆积。由于分子特殊的Bola结构, 大大降低了静电排斥作用, 促进了片层的侧向堆积, 导致了较宽螺旋带的形成, 它们进一步发生边缘融合而形成管状结构^[31]。另外, 研究

将位于短肽两端的K替换为H和R, 发现短肽组装体形貌出现显著变化, 皆形成带状结构^[24]。在Ac-KI₃-CONH₂分子中, 异亮氨酸(I)具有很强的 β 片层形成能力, 在组装中可提供疏水作用力, 而K赋予多肽亲水性并提供静电作用。在自组装过程中, Ac-KI₃-CONH₂分子C端羧基上的羰基氧作为氢键受体与另一个Ac-KI₃-CONH₂分子C端酰胺化后氨基上的氢形成氢键, 构成二聚体, 此时亲水氨基酸残基位于二聚体两端, 形成类似于Bola型短肽的结构, 并成为自组装中的最基本单元, 因此我们将这种肽称为类Bola型短肽。在组装过程中, 二聚体在短肽分子骨架间氢键作用的驱动下沿长轴方向生长, 形成片层结构。这些片层结构在侧链间疏水作用的驱动下进一步发生侧向堆积, 形成较宽的带状结构并进一步演变为纳米管^[32]。为进一步考察亲水氨基酸残基的替换对单头基短肽自组装行为的影响, 本文以Ac-KI₃-CONH₂为模板, 通过将亲水性的残基K分别替换为H和R, 设计合成了短肽Ac-HI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂, 系统考察了亲水氨基酸残基的种类对短肽自组装行为的影响。本研究设计合成的短肽含有3个疏水氨基酸残基I和1个亲水氨基酸残基。这种设计一方面使短肽在水中具有较好的溶解性, 另一方面则可以保证自组装体结构的形成。相比于K残基, H的侧链含咪唑基团, 它含有两个性质不同的氢原子, 因此既可以作为氢键的给体, 又可以作为氢键的受体。R的侧链胍基赋予氨基酸非常高的亲水性和极强的与水分子和其他侧链杂原子形成氢键的能力。此外, 胍基和咪唑基都是平面的, 因此可以导致R-R和H-H阳离子对的形成。研究系统考察了上述短肽的自组装行为, 探索了亲水氨基酸残基的改变对类Bola型短肽自组装行为的影响, 考察了组装体形成的动态过程, 阐明了不同氨基酸的引入对组装体形貌和手性的调控机制。

1 材料与方法

1.1 短肽纯度表征

1.1.1 质谱(MS)

配制1 mmol/L的短肽溶液, 将 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)溶解到TA30(体积比, 乙腈: 含0.1%三氟乙酸的超纯水=3: 7)溶液中, 然后超声溶解, 将其配制为饱和溶液并离心放置使用。将短肽溶液与TA30按照体积比1: 1混合均匀, 利用

移液枪吸取1 μl 混合液滴加到干净的样品板上自然干燥结晶,之后送入质谱仪的样品仓进行分析得到质谱图。

1.1.2 反相-高效液相色谱法 (RP-HPLC)

配制1 mmol/L的短肽溶液,利用0.22 μm 滤头过滤至液相测量瓶并放入样品仓进行分析实验。采用 C_{18} 反相液相色谱分析柱对短肽多肽纯度进行检测,待基线平稳后,用A相和B相对样品逐级梯度洗脱,其中流动相A为含0.1%三氟乙酸(TFA)的超纯水,B相为含0.1% TFA的乙腈,流动相的流速为0.6 ml/min,进样量为60 μl ,检测波长为214 nm,柱温为25 $^{\circ}\text{C}$ 。实验采用梯度洗脱,条件设置为:0~1 min, A相95%, B相5%; 1~45 min, A相95%~5%, B相5%~95%; 45~50 min, A相5%~95%, B相95%~5%。

1.2 溶液配制

根据实验要求,配制浓度为16 mmol/L的 $\text{Ac-KI}_3\text{-CONH}_2$ 、 $\text{Ac-HI}_3\text{-CONH}_2$ 和 $\text{Ac-RI}_3\text{-CONH}_2$ 溶液。具体配制方法如下:使用电子天平准确称量短肽并溶解在超纯水或混合溶剂中,而后利用涡旋混匀器涡旋振荡,待离心管中的样品完全溶解后,用封口膜将离心管封口后放在超声波清洗器中超声30 min(超声过程中需要放入冰袋,保证超声温度在30 $^{\circ}\text{C}$ 以下)。超声结束后,将多肽溶液密封,于室温静置1周左右,进行进一步的表征。上述样品的pH值在2.8~3.2之间,此时亲水氨基酸均接近完全质子化状态,每个短肽分子带有1个正电荷。

1.3 短肽组装体的二级结构表征

1.3.1 圆二色光谱术

首先打开氮气,通气约20 min后,依次打开氙灯、控制器和软件(这样可以排除装置中的氧气以防止氙灯氧化毁坏)。选择厚度为0.05 mm的样品池进行测定。实验参数设定如下:扫描范围190~260 nm,扫描速率120 nm/min,步长0.2 nm,光源带宽0.5 nm。在进行样品检测之前,首先对单独溶剂进行测定,扣除溶剂背景后再对样品溶液进行检测,3次测量后取平均值。

1.3.2 傅里叶变换红外光谱术

为了防止 H_2O 对酰胺I带测量峰的影响,将多肽固体粉末溶于重水(D_2O)中配制成多肽溶液,移取100~200 μl 孵育好的多肽溶液加入到氟化钙(CaF_2)样品池中。实验所使用配件为氟化钙样品池,中间是厚度为0.05 mm的聚四氟乙烯垫片,光谱扫描范围4 000~400 cm^{-1} ,设定扫描次数为64,

样品检测后需要对实验数据进行自动基线校正和平滑等处理,最后导出数据时需要扣除溶剂背景。

1.4 短肽组装体的形貌及结构信息表征

1.4.1 原子力显微术 (AFM)

取10~20 μl 的多肽溶液加到干净的云母片上进行吸附(不同的多肽溶液确定吸附时间不同),吸附2~3 min左右,用超纯水冲掉多余溶液,再用氮气轻轻吹扫至云母片表面干燥,放置在样品台上。按光源-控制器-软件的顺序启动仪器,选用ScanAsyst模式,将制备好的样品平放入样品载物台,并装上相应模式的探针。初始扫描范围设为10 μm ×10 μm ,后续根据组装体尺寸进行调整,扫描频率为1.0 Hz,分辨率为512。利用Nanoscope软件来分析组装体的形貌和高度等信息。

1.4.2 透射电子显微术 (TEM)

用移液枪吸取20~30 μl 多肽溶液铺展在干净的表面,将带有碳支持膜的铜网(溶剂为有机溶剂时用纯碳膜)正面放置在陈化的肽溶液上,一般吸附时间为3~5 min(根据样品黏度而定),吸附完成后用滤纸吸去多余溶液。随后将铜网放置在醋酸双氧钼(2%质量分数)染色剂上进行染色,6~8 min后用滤纸吸去多余液体,完全干燥后进行表征。表征过程中使用JEOL JEM-2100UHR型透射电子显微镜,其加速电压为200 kV,最后数据利用软件Gatan Digital Micrograph进行处理和分析。

1.4.3 低温透射电子显微术 (Cryo-TEM)

取约10 μl 多肽溶液滴在微栅支持膜上,吸附3~8 s后,迅速投入预冷却好至-165 $^{\circ}\text{C}$ 的液态乙烷中,接着将玻璃化样品转入液氮中,再将制好的样品转移到样品杆中。利用JEOL JEM-1400透射电子显微镜在约-174 $^{\circ}\text{C}$ 成像,加速电压设定为120 kV。

1.4.4 小角中子散射 (SANS)

首先配制浓度为16 mmol/L的多肽溶液,利用中国散裂中子源(中国广东省东莞市CSNS)的小角散射仪对组装体进行结构信息表征。由双盘带宽斩波器提供波长为1~10 $\text{\AA}$ 的入射中子,并通过一对光阑准直至样品。将样品到检测器的距离设置为4 m,并使用直径为6 mm的样品孔径,使用二维 ^3He 管阵列探测器可以覆盖0.005~0.70 $\text{\AA}^{-1}$ 的散射矢量模量(q)范围。分别对每个样品收集10 min和120 min的透射和散射信息,肽溶液样品的制备在 D_2O 中进行,并测量了 D_2O 作为基质背景,标准化、透射校正、标准样品(50%氘化聚苯乙烯)校

准和溶剂背景减去后, 将散射数据设置为绝对单位。使用SasView软件对扣除背景的原始数据进行拟合。

2 结果与讨论

2.1 短肽分子构成及纯度符合设计预期

首先, 利用反相-高效液相色谱仪及基质辅助的激光解析电离-飞行时间质谱仪对Ac-KI₃-CONH₂、Ac-RI₃-CONH₂和Ac-HI₃-CONH₂的纯度进行表征(图S1, S2)。RP-HPLC结果(图S1)表明, 三条短肽的谱图中均只出现一个明显的尖峰, 无其他杂峰出现, 对其峰面积进行积分发现, 它们的纯度均可以达到98%以上。MS结果表明, Ac-KI₃-CONH₂, Ac-RI₃-CONH₂和Ac-HI₃-CONH₂对应谱图在528.3、555.8和536.8处存在明显吸收(图S2), 分别对应3条短肽的[M+H]⁺峰, 这与它们的理论值527.72、555.73和536.69基本吻合, 表明合成分子为目标产物。MS中同样出现了对应两倍分子质量的峰, 表明短肽在组装过程中形成了二聚体。除此之外, 图中没有其他明显杂峰存在, 表明合成短肽具有较高纯度。

2.2 3种短肽组装体的形貌特征

为了探索靠近N端亲水性氨基酸的替换对短肽自组装行为的影响, 本研究系统考察了上述3条短肽的自组装行为, 发现亲水氨基酸的替换对单头基类Bola型短肽组装体的形貌、尺寸和手性均产生了显著影响。研究利用负染色透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)、Cryo-TEM以及原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)对短肽组装体的形貌进行了表征。

2.2.1 负染色TEM和Cryo-TEM表征

首先利用负染色TEM对三条短肽形成组装体的形貌进行了详细表征, 发现它们均形成了一维纳米结构, 但这些组装结构展示出不同的形貌和尺寸。负染色TEM结果表明, Ac-KI₃-CONH₂在水溶液中自组装形成了尺寸较大且均一的组装体, 其边缘两侧各有一条白色亮线, 主要是由染色剂在组装体内部沉积造成的^[33], 证明体系形成了纳米管结构, 它们的尺寸为210 nm左右(图1a, d)。更进一步的分析表明, 除了纳米管, TEM图片中还存在着少量的扭转(twist)带和螺旋(helical)带。同时还存在着螺旋带向纳米管转变的中间体。这两类带的主要区别是, 扭转带中 β 片层外围的扭曲程度低于中心附近, 而螺旋带中 β 片层在整个带状结构中

具有相同的螺旋曲率(类似于圆柱曲率)^[34]。一般来说, 扭转带是螺旋带的前体, 从扭转带向螺旋带的转变往往使组装体内的分子向着更稳定的方向重排。与Ac-KI₃-CONH₂类似, Ac-RI₃-CONH₂也自组装形成了纳米管, 它们的尺寸在175 nm左右(图1b, e)。更进一步的分析表明, 除了纳米管, TEM图片中也观察到扭转带和螺旋带的生成。值得一提的是, 在纳米管的管口, 我们发现了更多较细的螺旋带。这说明在扭转带转变为螺旋带的过程中, 伴随着组装体宽度的变化。纳米管的形成可能是由较粗的螺旋带演变而来, 也可能是由细的螺旋带演变而来。上述TEM结果还表明, 通过将序列中的K替换为R, 组装体的形貌并未发生显著变化, 它们仍然自组装形成了纳米管结构, 这与Bola型短肽明显不同。在Bola型短肽中, 当将K残基变为R残基时, Ac-RI₄R-CONH₂形成了双层扭转纳米带, 而Ac-KI₄K-CONH₂的组装体主要是纳米管结构。与Ac-KI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂明显不同, Ac-HI₃-CONH₂形成了较细的扭转带结构。为了避免负染色TEM表征时制样过程中的染色和干燥等操作对实验结果的影响, 研究利用Cryo-TEM对组装体尺寸和形貌进行了进一步表征(图1g, h)。可以看出, Ac-KI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂形成了较宽的组装体, 这些组装体的边缘为两条黑线, 证明体系均形成了纳米管结构, 它们的尺寸分别为170 nm和158 nm左右(图1d, e), 这与负染色TEM中的形貌表征结果一致。然而, 尺寸分析结果表明, Cryo-TEM得到的组装体尺寸明显较负染色TEM的小, 这主要是由于后者在制样过程中, 干燥导致样品坍塌造成的。对于短肽Ac-HI₃-CONH₂, 负染色TEM(图1c)和Cryo-TEM图片(图1i)均表明其形成了扭转带结构。粒径统计结果(图1f)表明, 它们的宽度在25~45 nm。同时, 负染色TEM图片的结果中能明显观察到纤维的手性特征, 但无法通过TEM照片判断其螺旋方向。

2.2.2 AFM表征

为了进一步获得上述短肽形成组装体的高度信息和手性特征, 通过AFM对组装体形貌进行了进一步表征。研究发现, Ac-KI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂能够自组装形成纳米管结构(图2)。图中能清晰观察到管口及螺旋带闭合为管的过程, 进一步说明纳米管是由螺旋带演变而来的(图2a, b, g, h)。利用AFM自带软件对其高度进行分析发现, Ac-KI₃-CONH₂形成的纳米管高度约为6 nm,

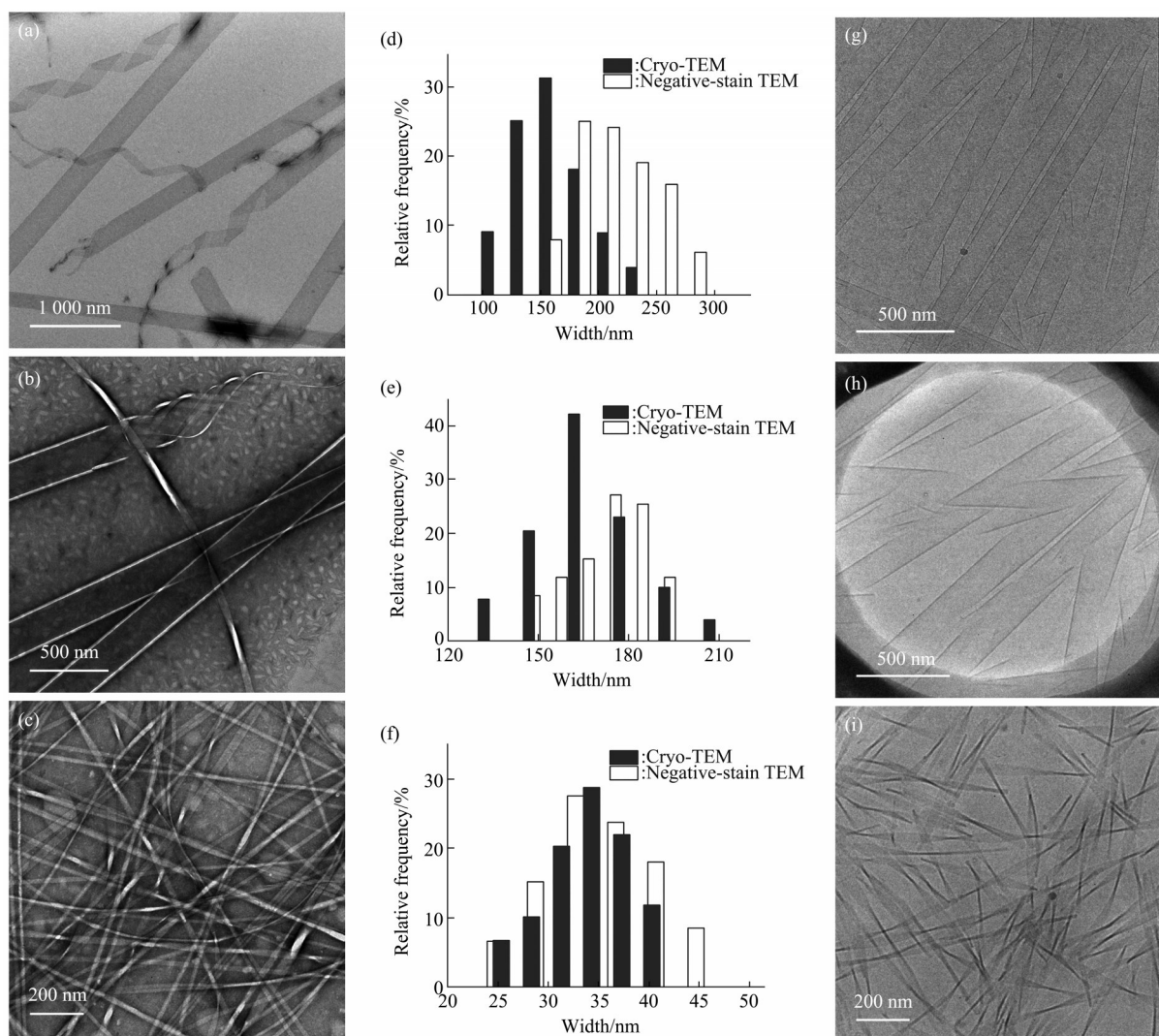


Fig. 1 TEM and Cryo-TEM characterization of Ac-KI₃-CONH₂, Ac-RI₃-CONH₂ and Ac-HI₃-CONH₂ self-assemblies

(a-c) The TEM image of Ac-KI₃-CONH₂ (a), Ac-RI₃-CONH₂ (b) and Ac-HI₃-CONH₂ (c). (d-f) The diameter statistics in TEM images and cryo-TEM images of Ac-KI₃-CONH₂ (d), Ac-RI₃-CONH₂ (e) and Ac-HI₃-CONH₂ (f). (g-i) The Cryo-TEM image of Ac-KI₃-CONH₂ (g), Ac-RI₃-CONH₂ (h) and Ac-HI₃-CONH₂ (i).

单层管口的高度为3 nm左右(图2a, d虚线),说明Ac-KI₃-CONH₂形成了双分子层纳米管。除了纳米管,体系还形成了很多螺旋带结构(图2a)。对它们的高度进行分析发现,带的折叠区域的高度为6 nm左右,而未折叠区域的高度为3 nm左右(图2a, d实线),分别为4倍和2倍分子长度,这进一步从侧面证明了纳米管是由螺旋带演变而来的。对于短肽Ac-RI₃-CONH₂, AFM表明组装体形貌主要为纳米管结构,与TEM结果吻合。除了纳米管,体系还形成了纤维结构,这些纤维具有明显的右手螺旋手性(图2b中箭头)。与Ac-KI₃-CONH₂形成管的过程类似,Ac-RI₃-CONH₂初步形成的多条扭

转带在疏水作用的驱动下形成了螺旋带,它们进一步闭合形成了纳米管(图2b中方框)。短肽Ac-RI₃-CONH₂形成纳米管的高度图约为6 nm(图2b, e),管壁同样为双分子层结构。

通过AFM表征不仅能获取组装体的高度信息,还能给出组装体的手性信息。由图2c箭头所指可以清晰地看出短肽Ac-HI₃-CONH₂形成了较细的左手扭转带结构,组装体高度在7~13 nm(图2c, i实线所示),说明该带为多层结构。这与短肽Ac-HI₄-CONH₂形成的无手性较宽平带明显不同。造成上述结果的主要原因是,在Bola型短肽Ac-HI₄-CONH₂中,由于两个H残基的存在,使得分

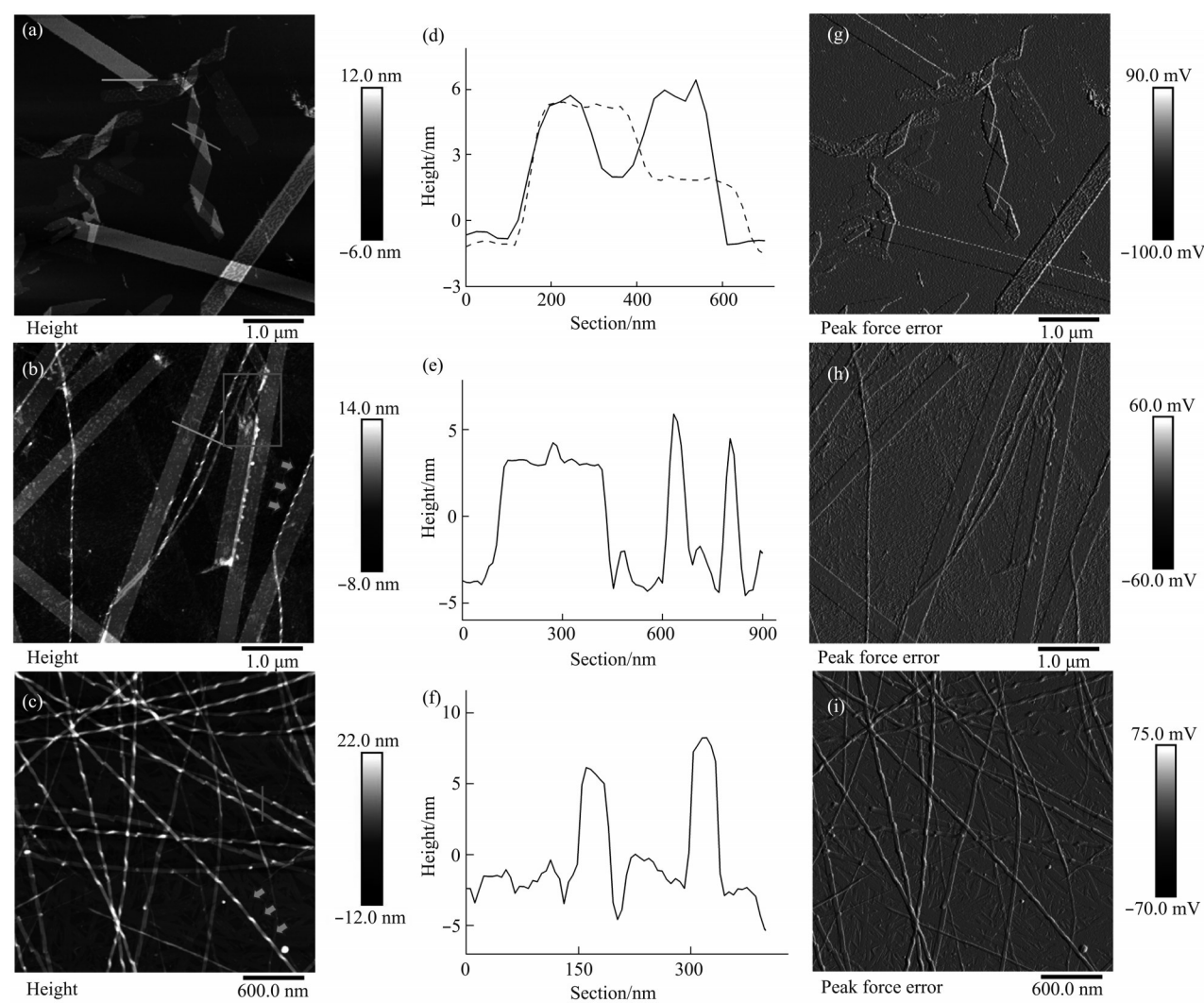


Fig. 2 The AFM characterization of Ac-KI₃-CONH₂, Ac-RI₃-CONH₂ and Ac-HI₃-CONH₂
(a-c) The AFM image of Ac-KI₃-CONH₂ nanotubes (a), Ac-RI₃-CONH₂ nanotubes (b) and Ac-HI₃-CONH₂ nanoribbons (c). (d-f) The cross-section profile of Ac-KI₃-CONH₂ nanotubes (d, correspond to lines in (a)), Ac-RI₃-CONH₂ nanotubes (e, correspond to lines in (b)), Ac-HI₃-CONH₂ nanoribbons (f, correspond to lines in (c)), The length of the line as the X-axis, the height of the corresponding region of the line pair as the Y-axis. (g-i) The peak force error images of Ac-KI₃-CONH₂ nanotubes (g), Ac-RI₃-CONH₂ nanotubes (h) and Ac-HI₃-CONH₂ nanoribbons (i).

子为对称结构, 促进了组装体的侧向堆积, 降低了片层的扭转趋势。对于 Ac-KI₃-CONH₂, 无法用 AFM 判断螺旋带的手性信息。为解决这一问题, 我们在体系中加入少量的有机溶剂六氟异丙醇 (HFIP), 来降低侧链间的疏水作用和氢键作用^[33, 35], 促进纤维结构的形成。研究表明, 当在体系中加入 5% 的 HFIP 时, 组装体结构主要以纳米纤维为主 (图 3a, b), 这些纳米纤维具有明显的左手螺旋手性。而 Ac-RI₃-CONH₂ 形成的纤维为右手螺旋 (图 3c, d)。上述结果表明, 通过改变 N 端

氨基酸的种类, 不仅可以改变组装体的形貌, 还可导致组装体的手性发生变化。侧链的空间位阻、侧链间相互作用以及侧链和水分子之间的氢键作用可能是导致手性发生反转的主要原因。当 K 残基替换为 R 残基时, Ac-RI₃-CONH₂ 中精氨酸侧链的胍基中的氮原子可以与水形成氢键, 产生更强的氢键相互作用, 同时引起亲水面积差异, 造成局部静电相互作用、空间位阻等的差异, 这些因素共同决定了 β 片层的扭转方向, 从而使得 Ac-RI₃-CONH₂ 形成的纤维较 Ac-KI₃-CONH₂ 发生了手性反转。

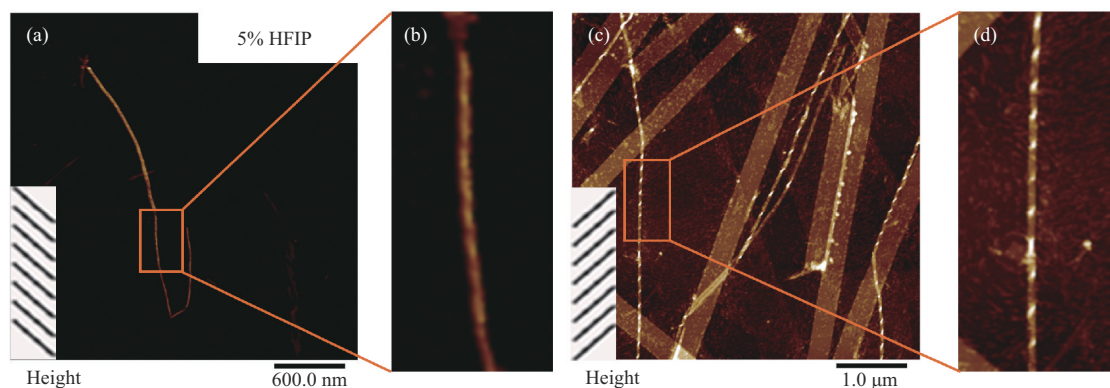


Fig. 3 The AFM images of the assemblies and its partial enlarged chirality view

(a, c) The AFM image of Ac-KI₃-CONH₂ self-assemblies in 5% hexafluoroisopropanol (HFIP) (a) and Ac-RI₃-CONH₂ self-assemblies in water (c). (b, d) Partial enlarged view of Ac-KI₃-CONH₂ self-assemblies (b) and Ac-RI₃-CONH₂ self-assemblies (d).

2.3 3种短肽组装体的二级结构特征

利用圆二色光谱术和傅里叶变换红外光谱术表征了组装体的二级结构（图4）。圆二色性（circular dichroism, CD）检测结果（图4a）表明，Ac-KI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂两条肽对应谱图在196 nm附近存在一个正峰，而在216 nm处存在一个明显的负峰，表明它们在水溶液中均形成了β片层结构。除了217 nm处的吸收峰，Ac-HI₃-CONH₂的CD谱图在202 nm也存在明显吸收，表明其二级结构可能为β片层与无规卷曲共存。傅里叶变换红

外（FTIR）光谱（图4b）表明，3条肽在1620 cm⁻¹附近均有明显的吸收峰，表明它们在组装过程中形成了β片层结构，这与CD结果基本吻合。此外，3条短肽对应的FTIR谱图在1672 cm⁻¹附近也出现明显的吸收峰，主要是由短肽合成过程中残留的三氟乙酸造成的^[36-37]。上述结果表明，当用亲水氨基酸R和H替换靠近N端的K残基时，它们的二级结构并未发生显著变化，体系均形成了以β片层为主的二级结构。这表明，亲水氨基酸残基的改变并没有显著影响片层的形成能力。

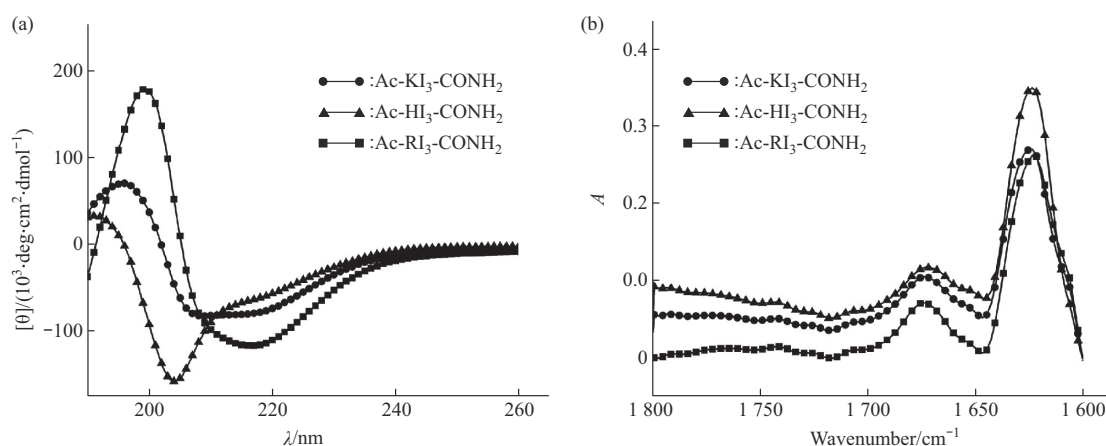


Fig. 4 CD and FTIR spectra of assemblies

(a) The CD spectra of Ac-KI₃-CONH₂, Ac-RI₃-CONH₂ and Ac-HI₃-CONH₂ solution. (b) The FTIR spectra of Ac-KI₃-CONH₂, Ac-RI₃-CONH₂ and Ac-HI₃-CONH₂ solution.

2.4 短肽组装体的结构信息

为了更进一步获取上述组装体在较小尺度的结构信息, 研究利用小角中子散射 (small-angle neutron scattering, SANS) 对它们进行了进一步表征。与TEM和AFM相比, SANS不仅可以进行溶液中自组装纳米结构的原位表征, 还能通过拟合确定其较短尺度结构参数。对于短肽Ac-KI₃-CONH₂, 尽管TEM和AFM清楚地表明它们形成了纳米管, 但SANS曲线在测量的 q 范围内没有表现出明显的振荡 (图5), 拟合结果表明, 中空圆柱体 (hollow cylinder, HC) 模型能很好地拟合Ac-KI₃-CONH₂体系对应的曲线, 拟合得到纳米管的壁厚

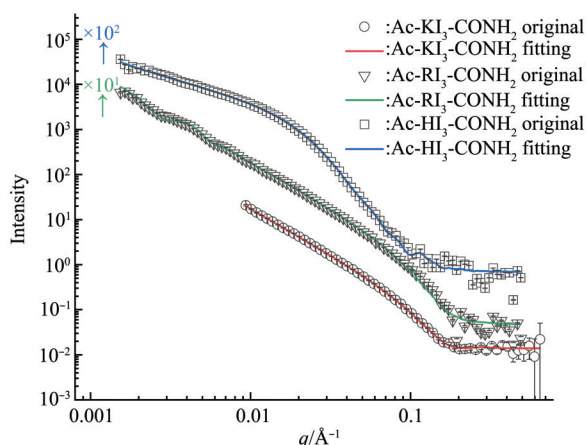


Fig. 5 The SANS data and fitted curves of assemblies

The SANS data and fitted curves of Ac-KI₃-CONH₂, Ac-RI₃-CONH₂ and Ac-HI₃-CONH₂ self-assemblies formed at the concentration of 16 mmol/L in D₂O. The signals of Ac-RI₃-CONH₂ were shifted vertically $\times 10^1$, the signals of Ac-HI₃-CONH₂ were shifted vertically $\times 10^2$.

为 (3.0 ± 0.3) nm。拟合得到的管径约为 300 nm 和 100 nm。对于短肽Ac-RI₃-CONH₂, 同样采取HC模型对曲线进行拟合, 得到的管壁厚度为 (2.9 ± 0.3) nm。而鉴于图中出现的管与螺旋带并存的形貌, 还尝试使用HC与层状 (Lamellar) 组合模型进行拟合, 得到纳米管的壁厚为 (3.0 ± 0.3) nm, 管径约为 204 nm。对于短肽Ac-HI₃-CONH₂体系, 其SANS曲线可通过柔性椭圆圆柱体 (flexible cylinder elliptical, FCE) 模型和圆柱体 (Cylinder) 模型组合模型拟合。拟合得到的半径为 10.4~14.5 nm, 高度约为 20 nm, 长径比为 0.45。综上所述, SANS结果与AFM和TEM结果基本吻合, 其中Ac-KI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂均形成了直径较大的双层纳米管, Ac-HI₃-CONH₂则形成了带状结构。

3 机理解释

上述结果表明, 亲水氨基酸残基的改变可显著影响组装体形貌, 不同类Bola型短肽组装体形成的过程如图6所示。我们以球棍模型表示单头基短肽分子, 在提出的类Bola型短肽自组装模型中, N端带正电的亲水氨基酸残基在溶剂化作用的驱动下暴露在组装体表面 (图中蓝色部分), 与溶剂水直接接触, 而疏水氨基酸残基I则在疏溶剂作用的驱动下形成疏水内核 (图中灰色部分)。一个短肽分子的C端羰基氧 (C=O) 与另一个短肽分子的C端酰胺氢 (NH) 形成氢键 (图中黄色部分) (依据图S2中MS结果推断)。在组装过程中, 这些二聚体

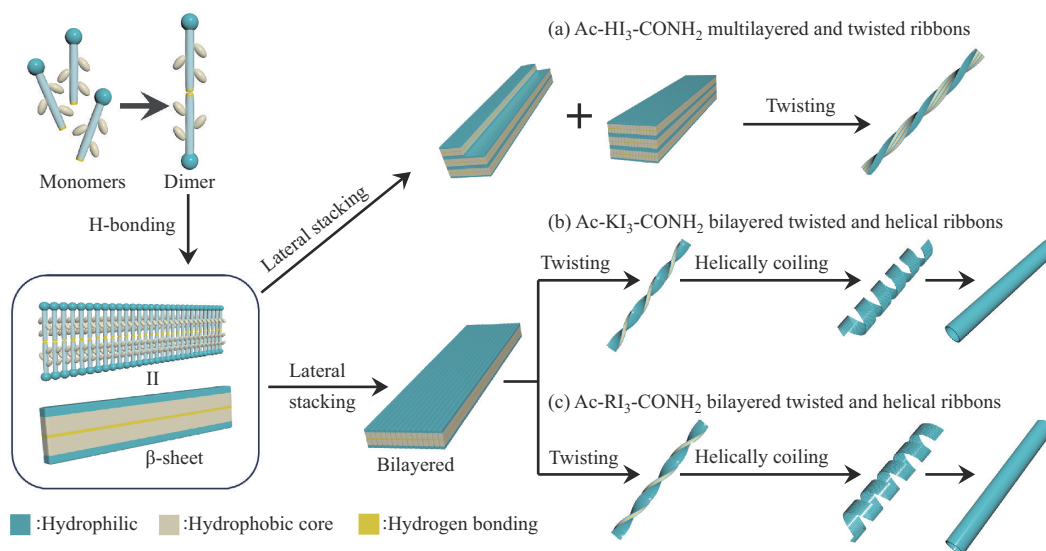


Fig. 6 Schematic illustration for the effects of hydrophilic amino acids on the self-assembly morphologies and chirality

(a) Ac-HI₃-CONH₂, (b) Ac-KI₃-CONH₂, and (c) Ac-RI₃-CONH₂.

在短肽分子骨架间氢键的作用下沿长轴方向发生堆积,形成片层结构。由于I的强疏水性,这些片层结构在侧链间疏水作用的驱动下进一步发生侧向堆积,从而形成宽度不同的组装体。而组装体的高度主要取决于亲水氨基酸残基之间的静电作用以及一些特殊相互作用(如H-H作用)。该二聚体中亲水氨基酸分别位于分子两端,与Bola型短肽类似,从而展示出相似的组装特性。Ac-KI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂均形成了直径较大的双层纳米管,这些纳米管是由扭转带转变为螺旋带,并进一步发生边缘融合形成的。然而,通过调控组装条件,发现Ac-KI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂形成纤维的手性相反,这可能是由于当K残基替换为R残基时,R侧链的胍基可以与水形成氢键,产生更强的氢键相互作用,使得非共价键力的平衡发生了变化,并最终导致纤维手性发生反转(图6b, c)。当K残基被替换为H残基时,其既可作为氢键的供体,也可作为氢键的受体,促进组装体在高度方向的生长,而咪唑环之间的位阻效应,在一定程度上限制了片层的进一步侧向堆积。上述因素共同导致Ac-HI₃-CONH₂形成具有较大高度和较小宽度的左手螺旋纤维(图6a)。同时,相比于亲水氨基酸对Bola型短肽的影响,其对单头基类Bola型短肽展示出不同的影响趋势。类Bola型短肽由于二聚体的形成,分子相较于Bola型短肽更加柔软,二聚体内部疏水氨基酸数量的增加也会增强其疏水性。相比于Ac-KI₄K-CONH₂形成的纳米管,类Bola结构的形成导致二聚体中I残基的数目较多,更大程度上促进了组装体的侧向堆积,Ac-KI₃-CONH₂最终形成了更宽的管状结构。同时,由于二聚体的形成,组装体纳米管的厚度也由单层变为了双层结构。相比于Ac-RI₄R-CONH₂形成的双层扭转带,Ac-RI₃-CONH₂在形成二聚体后,较强的疏水作用更大幅度地平衡了R残基的引入对高度方向生长的贡献,促进了片层沿宽度方向的生长,导致Ac-RI₃-CONH₂形成的组装体宽度较大(~175 nm),但较Ac-KI₃-CONH₂的明显减小(~210 nm)。与Ac-HI₄H-CONH₂形成的多层平带相比,Ac-HI₃-CONH₂在形成二聚体后,由于I残基的数目增多,导致H-H作用受到显著影响,体系形成了具有左手手性的纳米纤维。

4 结 论

本研究系统考察了亲水氨基酸残基的改变对单

头基类Bola型短肽自组装行为的影响,发现亲水氨基酸残基的改变对骨架间氢键作用影响较小,3种短肽均能够形成具有 β 片层结构的一维纳米纤维。然而,亲水氨基酸残基的改变可显著影响组装体形貌,其中Ac-KI₃-CONH₂和Ac-RI₃-CONH₂形成了尺寸很大的纳米管结构,这些纳米管是由纤维演变而来的。相比于Ac-KI₃-CONH₂,由于R间R-R分子对的形成,以及R与水分子的相互作用的不同,导致Ac-RI₃-CONH₂形成纤维的手性发生了明显偏转。当K被替换为H残基时,由于咪唑环的存在,H残基中的咪唑环既可以作为氢的供体,又可以作为氢的受体,这一特性促进了组装体沿高度方向的生长,并最终导致了Ac-HI₃-CONH₂多层扭转带的形成。上述研究表明,通过改变亲水氨基酸残基的种类,可有效调控不同非共价键力平衡,控制组装体的形貌和手性。由于亲水氨基酸K/R/H分布于组装体的内外表面,这些组装体在不同领域展示出潜在的应用价值,上述研究工作为功能性材料的开发提供了理论依据,可促进肽基组装材料在不同领域的应用。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB_20240502_Figure_S1.pdf

PIBB_20240502_Figure_S2.pdf

参 考 文 献

- [1] Bai Y, Luo Q, Liu J. Protein self-assembly via supramolecular strategies. *Chem Soc Rev*, 2016, **45**(10): 2756-2767
- [2] Dobson C M. Protein folding and misfolding. *Nature*, 2003, **426**(6968): 884-890
- [3] Ke P C, Sani M A, Ding F, *et al.* Implications of peptide assemblies in amyloid diseases. *Chem Soc Rev*, 2017, **46**(21): 6492-6531
- [4] Chiti F, Dobson C M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu Rev Biochem*, 2017, **86**: 27-68
- [5] Knowles T P J, Vendruscolo M, Dobson C M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, **15**(6): 384-396
- [6] Sawaya M R, Sambashivan S, Nelson R, *et al.* Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature*, 2007, **447**(7143): 453-457
- [7] Xu X D, Liang L, Chen C S, *et al.* Peptide hydrogel as an intraocular drug delivery system for inhibition of postoperative scarring formation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2010, **2**(9): 2663-2671
- [8] Jayawarna V, Ali M, Jowitt T A, *et al.* Nanostructured hydrogels

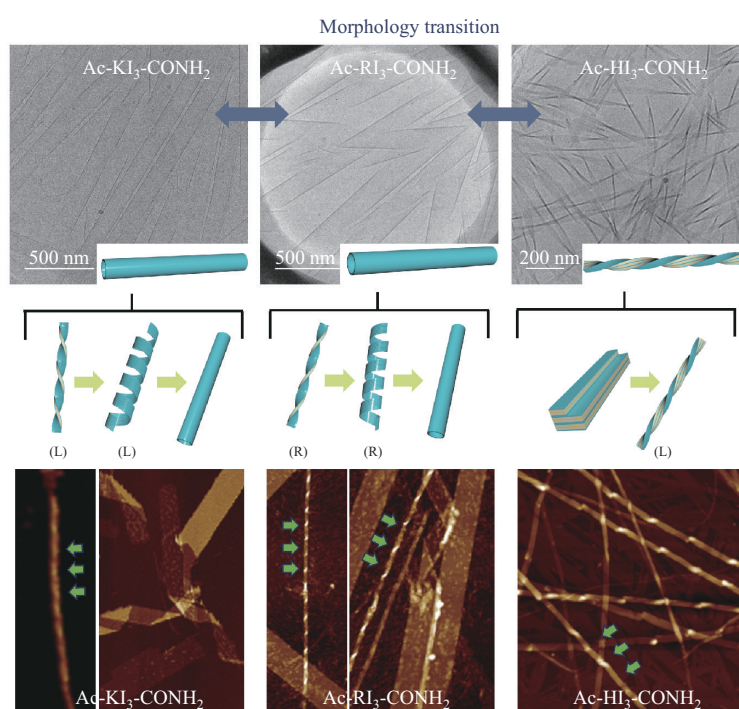
- for three-dimensional cell culture through self-assembly of fluorenylmethoxycarbonyl-dipeptides. *Adv Mater*, 2006, **18**(5): 611-614
- [9] Yuan C, Ji W, Xing R, *et al.* Hierarchically oriented organization in supramolecular peptide crystals. *Nat Rev Chem*, 2019, **3**(10): 567-588
- [10] Mart R J, Osborne R D, Stevens M M, *et al.* Peptide-based stimuli-responsive biomaterials. *Soft Matter*, 2006, **2**(10): 822-835
- [11] Edwards-Gayle C J C, Hamley I W. Self-assembly of bioactive peptides, peptide conjugates, and peptide mimetic materials. *Org Biomol Chem*, 2017, **15**(28): 5867-5876
- [12] Wang W, Chau Y. Self-assembly mediated platform for rapid and facile preparation of peptide-functionalized nanoparticles with high stability. *Chem Mater*, 2012, **24**(5): 946-953
- [13] Matson J B, Stupp S I. Self-assembling peptide scaffolds for regenerative medicine. *Chem Commun*, 2012, **48**(1): 26-33
- [14] Fichman G, Gazit E. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: design of building blocks, physical properties and technological applications. *Acta Biomater*, 2014, **10**(4): 1671-1682
- [15] Wang M, Zhou P, Wang J, *et al.* Left or right: how does amino acid chirality affect the handedness of nanostructures self-assembled from short amphiphilic peptides?. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(11): 4185-4194
- [16] Yuan S C, Lewis J A, Sai H, *et al.* Peptide sequence determines structural sensitivity to supramolecular polymerization pathways and bioactivity. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(36): 16512-16523
- [17] Hutchinson J A, Burholt S, Hamley I W. Peptide hormones and lipopeptides: from self-assembly to therapeutic applications. *J Pept Sci*, 2017, **23**(2): 82-94
- [18] Cui H, Cheetham A G, Pashuck E T, *et al.* Amino acid sequence in constitutionally isomeric tetrapeptide amphiphiles dictates architecture of one-dimensional nanostructures. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(35): 12461-12468
- [19] Cui H, Muraoka T, Cheetham A G, *et al.* Self-assembly of giant peptide nanobelts. *Nano Lett*, 2009, **9**(3): 945-951
- [20] Sangji M H, Sai H, Chin S M, *et al.* Supramolecular interactions and morphology of self-assembling peptide amphiphile nanostructures. *Nano Lett*, 2021, **21**(14): 6146-6155
- [21] Xing Q, Zhang J, Xie Y, *et al.* Aromatic motifs dictate nanohelix handedness of tripeptides. *ACS Nano*, 2018, **12**(12): 12305-12314
- [22] Zhao Y, Yang W, Wang D, *et al.* Controlling the diameters of nanotubes self-assembled from designed peptide bolaphiles. *Small*, 2018, **14**(12): 1703216
- [23] De Leon Rodriguez L M, Hemar Y, Cornish J, *et al.* Structure-mechanical property correlations of hydrogel forming β -sheet peptides. *Chem Soc Rev*, 2016, **45**(17): 4797-4824
- [24] Zhao Y, Deng L, Yang W, *et al.* Tuning one-dimensional nanostructures of bola-like peptide amphiphiles by varying the hydrophilic amino acids. *Chem*, 2016, **22**(32): 11394-11404
- [25] Epand R F, Pollard J E, Wright J O, *et al.* Depolarization, bacterial membrane composition, and the antimicrobial action of ceragenins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, **54**(9): 3708-3713
- [26] Steiner H, Hultmark D, Engström Å, *et al.* Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 1981, **292**(5820): 246-248
- [27] Kim S, Hyun S, Lee Y, *et al.* Nonhemolytic cell-penetrating peptides: site specific introduction of glutamine and lysine residues into the α -helical peptide causes deletion of its direct membrane disrupting ability but retention of its cell penetrating ability. *Biomacromolecules*, 2016, **17**(9): 3007-3015
- [28] Mello L R, Hamley I W, Castelletto V, *et al.* Self-assembly and intracellular delivery of DNA by a truncated fragment derived from the Trojan peptide Penetratin. *Soft Matter*, 2020, **16**(20): 4746-4755
- [29] von Maltzahn G, Vauthey S, Santoso S, *et al.* Positively charged surfactant-like peptides self-assemble into nanostructures. *Langmuir*, 2003, **19**(10): 4332-4337
- [30] Hu Y, Lin R, Zhang P, *et al.* Electrostatic-driven lamination and untwisting of β -sheet assemblies. *ACS Nano*, 2016, **10**(1): 880-888
- [31] Zhao Y, Wang J, Deng L, *et al.* Tuning the self-assembly of short peptides *via* sequence variations. *Langmuir*, 2013, **29**(44): 13457-13464
- [32] Zhao Y, Qi H, Zhang L, *et al.* Exploiting terminal charged residue shift for wide bilayer nanotube assembly. *J Colloid Interface Sci*, 2023, **629**: 1-10
- [33] Lin Y A, Cheetham A G, Zhang P, *et al.* Multiwalled nanotubes formed by catanionic mixtures of drug amphiphiles. *ACS Nano*, 2014, **8**(12): 12690-12700
- [34] Pashuck E T, Stupp S I. Direct observation of morphological transformation from twisted ribbons into helical ribbons. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(26): 8819-8821
- [35] Amdursky N, Molotskii M, Gazit E, *et al.* Elementary building blocks of self-assembled peptide nanotubes. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(44): 15632-15636
- [36] Mello L R, Aguiar R B, Yamada R Y, *et al.* Amphipathic design dictates self-assembly, cytotoxicity and cell uptake of arginine-rich surfactant-like peptides. *J Mater Chem B*, 2020, **8**(12): 2495-2507
- [37] Glossop H D, De Zoysa G H, Hemar Y, *et al.* Battacin-inspired ultrashort peptides: nanostructure analysis and antimicrobial activity. *Biomacromolecules*, 2019, **20**(7): 2515-2529

Effect of The Hydrophilic Amino Acids on Self-assembly Behavior of Short Bola-like Peptides*

GAO Xin-Xin, HAN Yu, ZHOU Yi-Lin, CHEN Xi-Ya, ZHAO Yu-Rong**

(College of Chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum (East China), Qingdao 266580, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Bola-like short peptides exhibit novel self-assembly properties due to the formation of peptide dimers *via* hydrogen bonding interactions between their C-terminals. In this configuration, hydrophilic amino acids are distributed at both terminals, making these peptides behave similarly to Bola peptides. The electrostatic repulsive interactions arising from the hydrophilic amino acids at each terminal can be neutralized, thereby greatly promoting the lateral association of β -sheets. Consequently, assemblies with significantly larger widths are typically the dominant nanostructures for Bola-like peptides. To investigate the effect of hydrophilic amino acids on the self-assembly behavior of Bola-like peptides, the peptides Ac-RI₃-CONH₂ and Ac-HI₃-CONH₂ were designed and synthesized using the Bola-like peptide Ac-KI₃-CONH₂ as a template. Their self-assembly

* This work was supported by a grant from National Key Research and Development Program (2023YFC2811003).

** Corresponding author.

Tel: 86-532-86981562, E-mail: yurongzhao@upc.edu.cn

Received: December 4, 2024 Accepted: February 13, 2025

behavior was systematically examined. **Methods** Atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM) were employed to characterize the morphology and size of the assemblies. The secondary structures of the assemblies were analyzed using circular dichroism (CD) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Small-angle neutron scattering (SANS) was used to obtain detailed structural information at a short-length scale. Based on these experimental results, the effects of hydrophilic amino acids on the self-assembly behavior of Bola-like short peptides were systematically analyzed, and the underlying formation mechanism was explored. **Results** The aggregation process primarily involved three steps. First, peptide dimers were formed through hydrogen bonding interactions between their C-terminals. Within these dimers, the hydrophilic amino acids K, R, and H were positioned at both terminals, enabling the peptides to self-assemble in a manner similar to Bola peptides. Next, β -sheets were formed *via* hydrogen bonding interactions along the peptide backbone. Finally, self-assemblies were generated through the lateral association of β -sheets. The results demonstrated that both Ac-KI₃-CONH₂ and Ac-RI₃-CONH₂ could self-assemble into double-layer nanotubes with diameters of approximately 200 nm. These nanotubes were formed by the edge fusion of helical ribbons, which initially emerged from twisted ribbons. Notably, the primary assemblies of these peptides exhibited opposite chirality: nanofibers formed by Ac-KI₃-CONH₂ displayed left-handed chirality, whereas those formed by Ac-RI₃-CONH₂ exhibited right-handed chirality. This reversal in torsional direction was primarily attributed to the different abilities of K and R to form hydrogen bonds with water. In contrast, Ac-HI₃-CONH₂ formed narrower twisted ribbons with a significantly reduced width of approximately 30 nm, which was attributed to the strong steric hindrance caused by the imidazole rings. The multilayer height of these ribbons was mainly due to the unique structure of the imidazole rings, which can function as both hydrogen bond donors and acceptors, thereby promoting aggregate growth in the vertical direction. **Conclusion** The final morphology of the self-assemblies resulted from a delicate balance of various non-covalent interactions. By altering the types of hydrophilic amino acid residues in Bola-like short peptides, the relative strength of non-covalent interactions that drive assembly formation can be effectively regulated, allowing precise control over the morphology and chirality of the assemblies. This study provides a simple and effective approach for constructing diverse self-assemblies and lays a theoretical foundation for the development of functional biomaterials.

Key words peptide, self-assembly, non-covalent interactions, hydrophilic amino acids

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0502

CSTR: 32369.14.pibb.20240502