

光谱法结合化学计量学研究石墨烯量子点与胰蛋白酶的相互作用

张秋兰, 朱 智, 温子健, 倪永年

南昌大学化学学院, 江西 南昌 330031

摘 要 石墨烯量子点(GQDs)以其优异的性能在生物医学领域引起了广泛的关注,但其潜在的毒性研究较少。将荧光和紫外光谱法结合化学计量学研究 GQDs 对胰蛋白酶结构和功能的影响。从荧光猝灭实验可知, GQDs 可猝灭胰蛋白酶的固有荧光并抑制胰蛋白酶的生物活性。当加入不同浓度的 GQDs, 胰蛋白酶在 350 nm 处的荧光发射峰的强度随之降低且蓝移(350~344 nm), 表明 GQDs 可改变胰蛋白酶所处的微环境, 使其疏水性增加; 与此同时, GQDs 浓度越高, 胰蛋白酶荧光变化越明显, 说明 GQDs 对胰蛋白酶可能有潜在毒性。通过圆二色谱实验可知胰蛋白酶的 α -螺旋结构由 19.12% 下降至 16.23%, 说明 GQDs 加入诱导胰蛋白酶的二级结构发生改变, 使胰蛋白酶骨架松弛; 三维荧光光谱实验进一步说明 GQDs 的存在不仅改变了胰蛋白酶所处的微环境并使胰蛋白酶的构象发生变化。蛋白质氨基酸残基的微环境由蛋白质分子的构象所决定, 当蛋白质的生色团所处的微环境发生变化时, 其紫外-可见吸收光谱也随之发生变化。由于生命作用体系都比较复杂, 测量所得到的波谱数据中大部分信息是隐含和重叠的, 因此需要利用和发展有效的生物信号采集、转导、数据处理和解析方法, 把能对生命现象做出解释的有用信息尽可能多地从测量数据中挖掘出来。为获取足够而有效的生命化学信息, 该研究用连续滴定技术采集多维光谱数据, 运用多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)解析光谱数据矩阵, 从重叠严重的光谱中同时得到定性(各组分光谱及作用过程中复合物的真实存在)和定量(各组分的浓度变化趋势)信息, 从而认识 GQDs 与胰蛋白酶在作用中达到平衡时各组分的状态和整个动态变化过程。MCR-ALS 的解析结果为进一步了解 GQDs 与胰蛋白酶相互作用的动力学过程提供了依据, 说明 GQDs 可以与胰蛋白酶相互作用, 并形成 GQDs₁₅-胰蛋白酶复合物。该研究为 GQDs 可能存在的毒性风险研究提供了信息。

关键词 光谱法; 化学计量学; 石墨烯量子点; 胰蛋白酶; 生物活性; 作用过程

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)10-3141-06

引 言

荧光石墨烯量子点(GQDs)具有良好的化学惰性和生物相容性,以及荧光发光可调和荧光上转换等特性,已成为生物成像、药物运输、疾病检测和荧光探针等领域的研究热点^[1]。因 GQDs 在靶向药物递送和改变血脑屏障等方面的应用受到了极大的关注,人们对评估 GQDs 在生物系统中的潜在毒性风险越来越感兴趣^[2]。已有文献报道石墨烯纳米材料可能导致严重的细胞毒性和肺部疾病^[3],但有关 GQDs 毒性研究或生物学效应的报道较少。Huang 等^[4]和 Lu 等^[5]分别研究了 GQDs 与人血清白蛋白和 DNA 的相互作用,为评价 GQDs 在生物医学领域的毒性和生物学效应提供了依据。然

而,有关 GQDs 的毒理学研究还有待深入。

胰蛋白酶(trypsin, Tryp)是胰腺分泌的一种丝氨酸蛋白酶,其分子为 23 300,由 223 个氨基酸残基组成,在脊椎动物的消化、蛋白质成熟、凋亡、凝血、免疫反应等生理过程中起着重要的作用。近年来,胰蛋白酶得到了广泛的应用,对胰蛋白酶的研究也时有报道,例如药物分子和纳米粒子与胰蛋白酶的相互作用^[6-7],谷胱甘肽包裹的 CdTe 量子点和 CdSe 量子点与胰蛋白酶的作用^[8-9]。然而,在分子水平上 GQDs 对胰蛋白酶的毒性研究尚未见报道。

纳米材料与生物大分子作用以紫外可见分光光度法、荧光和红外光谱、圆二色谱法等为主要技术,由于生命作用体系都比较复杂,需要利用和发展化学计量学方法,把能对生命现象做出解释的有用信息尽可能地从测量数据中挖掘出

收稿日期: 2019-08-30, 修订日期: 2019-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(21665017)和中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室开放基金项目(SKLEAC201902)资助

作者简介: 张秋兰,女,1979年生,南昌大学化学学院副教授 e-mail: qlzhang@ncu.edu.cn

来。继以往将化学计量学方法用于银纳米粒子与血清蛋白作用后研究^[10], 本工作将多维数据解析用于 GQDs 与胰蛋白酶的, 为 GQDs 对人体健康的潜在毒性风险提供有价值的信息。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

石墨烯量子点(graphene quantum dots, GQDs, 南京先丰纳米材料科技有限公司, 纯度~90%, 量子点<10 nm, 量子产率~5%, 分子量 78)用二次蒸馏水配成 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液备用, 4 °C 以下冰箱保存。胰蛋白酶(国药集团化学试剂有限公司, 分子量 23 800, 干燥失量≤10.0%, 酶活力($\mu \cdot \text{g}^{-1}$)25 000, 淡黄色粉末用二次蒸馏水溶解成 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液备用。N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(上海生工, 白色结晶或粉末, 溶于水, 纯度大于 98%, 分子量 342.82)用二次蒸馏水溶解成 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液备用。日立 F-7000(日本日立公司)荧光分光光度计(配备 1.0 cm 荧光比色皿), 狭缝宽度 $E_x=5 \text{ nm}$, $E_m=10 \text{ nm}$, 扫描电压为 700 V, 扫描速度 $2 400 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$; Agilent 8453 紫外可见光光度计(美国安捷伦公司); 圆二色谱仪(法国 Bio-Logic 公司); 超级恒温水槽 ZC-10(宁波天恒仪器厂)。

1.2 方法

将 3.0 mL pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液加入比色皿中, 根据实验需要依次加入适量的 GQDs 和 Tryp 溶液。

实验 1: 固定 Tryp 的浓度 ($4.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 再加入不同量的 GQDs, 使其浓度分别为 0, 1.67, 3.33, ..., $13.33 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (浓度间隔 $1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),

放置 5 min 以达平衡, 在 298 K 测其荧光光谱。

实验 2: 固定 Tryp 的浓度 ($3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 加入不同量的 GQDs, 使 $[\text{GQDs}]: [\text{Tryp}] = 0, 5, 10, 15, 20$, 在 298 K 测其圆二色谱。所得到的 CD(circular dichroism, CD)谱为三次扫描的平均值, 并通过缓冲信号进行校正。

实验 3: 固定 Tryp 的浓度 ($4.17 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 再加入 GQDs, 使 $[\text{GQDs}]: [\text{Tryp}] = 10$, 在 298 K 下测其三谱荧光。

1.3 酶活性

实验 4: N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)在波长 253 nm 下的紫外吸收远小于其水解产物 N-苯甲酰-L-精氨酸(BA)的紫外吸收^[11]。在胰蛋白酶的催化下, BAEE 酯键水解产物 BA 逐渐增多, 体系的紫外吸收也随之增加。胰蛋白酶的活性以 $\Delta A_{253 \text{ nm}}$ 计算。在 3.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液中固定 Tryp 的浓度 ($4.17 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 然后加入不同量的 GQDs ($0 \sim 8.33 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 间隔 $8.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 在 37 °C 孵化 2 h 后, 再加 BAEE ($1.67 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 测 GQDs 存在和不存在下的紫外吸收光谱。

1.4 扩展矩阵数据的构建

实验 5: (UV-Vis (ultraviolet visible, UV-Vis) 法, D^{Tryp}): 固定 Tryp 的浓度 ($1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 加入不同浓度的 GQDs ($0 \sim 3.33 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 间隔 $1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

实验 6: (UV-Vis 法, D^{GQDs}): 固定 GQDs 的浓度 ($1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 加入不同浓度的 Tryp ($0 \sim 2.22 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 间隔 $1.11 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

以上紫外光谱数据采集范围均为 200~500 nm(间隔 1 nm, 301 个数据点), 见表 1。

表 1 不同实验条件下得到的 2 个波谱数据矩阵

Table 1 The experimental conditions to build up the extension matrices

Experiment	$c_{\text{Tryp}}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$c_{\text{GQDs}}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Interval/ $(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Number	Data matrix
5	1.67×10^{-5}	$0 \sim 3.33 \times 10^{-4}$	1.67×10^{-5}	21	D^{Tryp}
6	1.67×10^{-5}	$0 \sim 2.22 \times 10^{-6}$	1.11×10^{-7}	21	D^{GQDs}

1.5 化学计量学方法: 多元曲线分辨-交替最小二乘法 (MCR-ALS)

经典的多元曲线分辨-交替最小二乘法(multivariate curve resolution-alternating least squares, MCR-ALS)法在处理体系测量数据时所得到的信息相对简单孤立, Tauler 对其进行了拓展和改进^[12]。本工作通过 UV-Vis 技术采用两种滴加方式获得 2 个波谱数据矩阵(见表 1)后, 将这 2 个矩阵 D^{Trypsin} (实验 5) 和 D^{GQDs} (实验 6) 在列的方向组成一扩展矩阵, 再用 MCR-ALS 解析; 多维数据解析方法最大的优势在于可获得多维阵唯一的分解结果, 即分辨出体系中感兴趣组分的相对浓度和光谱趋势图。

$$\begin{bmatrix} D^{\text{Trypsin}} \\ D^{\text{GQDs}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C^{\text{Trypsin}} \\ C^{\text{GQDs}} \end{bmatrix} [S^T] + \begin{bmatrix} E^{\text{Trypsin}} \\ E^{\text{GQDs}} \end{bmatrix} \quad (1)$$

式(1)中 $\begin{bmatrix} D^{\text{Trypsin}} \\ D^{\text{GQDs}} \end{bmatrix}$ 表示两种不同测量技术得到的扩展数据矩

阵, $\begin{bmatrix} C^{\text{Trypsin}} \\ C^{\text{GQDs}} \end{bmatrix}$ 和 $[S^T]$ 分别表示解析得到的两种不同滴加方式的浓度趋势图和纯物质的光谱。从式(1)解析得到的 $\begin{bmatrix} C^{\text{Trypsin}} \\ C^{\text{GQDs}} \end{bmatrix}$ 和 $[S^T]$ 可得到体系成分的相关信息^[13]。一般来说, 进行 MCR-ALS 计算前可先用奇异值分解(SVD)和渐进因子分析法(EFA)确定体系的因子数(组分数), 再用 EFA 得到的浓度初值作为初始的迭代矩阵, 由交替最小二乘法(ALS)估算出各组分的波谱矩阵后, 通过最小二乘法获取估量的各组分浓度矩阵再用于下一轮迭代, 直至收敛为止。

2 结果与讨论

2.1 GQDs 与胰蛋白酶作用的荧光光谱

酶的荧光性质来自色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸残基。固

定胰蛋白酶, 加入不同浓度的 GQDs。表明 GQDs 可改变胰蛋白酶所处的微环境, 使其疏水性增加^[14]。与此同时, GQDs 浓度越高, 胰蛋白酶荧光变化越明显(1→9, 下降了近 16%), 说明 GQDs 可与胰蛋白酶作用并改变大分子的二级结构^[15]。

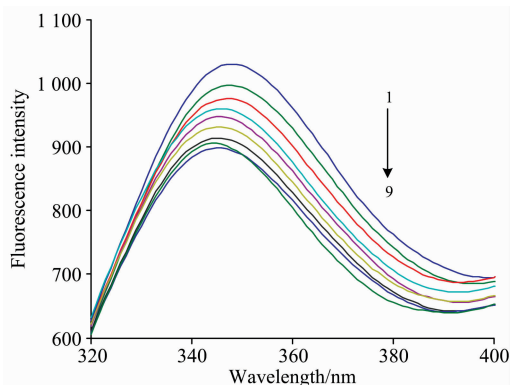


图 1 GQDs 与胰蛋白酶作用的荧光光谱图
Fig. 1 The fluorescence spectra of the interaction of GQDs with trypsin

2.2 GQDs 对胰蛋白酶构象的影响

2.2.1 圆二色谱法

圆二色谱是一种准确灵敏的检测蛋白质构象变化的方法。利用远紫外(200~260 nm)可测定蛋白质的二级结构。在没有和存在 GQDs 的情况下, 胰蛋白酶的 CD 谱如图 2 所示。胰蛋白酶在 210 nm 左右呈负谱带, 不存在正峰。在胰蛋白酶溶液中加入 GQDs 后, CD 信号出现小幅下降, 但峰的形状和位置没有明显变化, 说明与 GQDs 结合时胰蛋白酶的二级结构展开, 但基本结构保持完整。用公式^[16]计算得到胰蛋白酶的 α -螺旋结构由 19.12% 下降至 16.23%, 进一步说明 GQDs 加入可诱导胰蛋白酶的二级结构发生改变, 使胰蛋白酶骨架松弛^[17]。

2.2.2 三维荧光光谱法

三维荧光光谱可证明蛋白质构象特征的变化。图 3(a)和

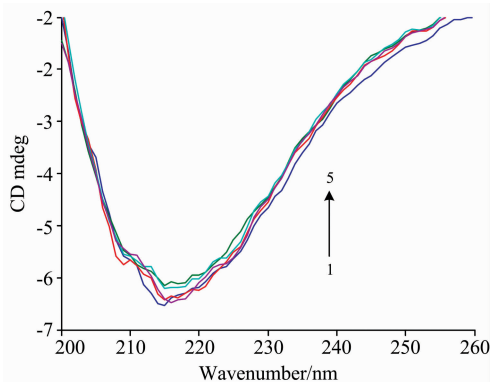


图 2 GQDs 与胰蛋白酶作用的 CD 图

$c_{\text{Tryp}} = 3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1→5 表示 $[\text{GQDs}] : [\text{Tryp}] = 0, 5, 10, 15, 20$

Fig. 2 The CD spectra of the interaction of GQDs with trypsin

$c_{\text{Tryp}} = 3.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{GQDs}] : [\text{Tryp}] = 0, 5, 10, 15, 20$

(b)是胰蛋白酶和石墨烯量子点的三维荧光光谱。峰 1 和峰 2 是瑞利散射峰($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$)和二阶散射峰($2\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$)^[19]。峰 a ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 344 \text{ nm}$, $I = 1548$)与色氨酸和酪氨酸残基从 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的荧光特性有关, 加入石墨烯量子点后 [$\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 337 \text{ nm}$, I_F (fluorescence intensity) = 1529] 反映了胰蛋白酶的二级结构变化。峰 b ($\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 322 \text{ nm}$, $I = 1474$)是胰蛋白酶多肽骨架结构的荧光特征, 主要是由 $n \rightarrow \pi^*$ 的跃迁引起的, 表明石墨烯量子点存在下胰蛋白酶的二级结构变化($\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 318 \text{ nm}$, $I = 366$)。加入 GQDs 后, 胰蛋白酶峰 a 和峰 b 的荧光强度值明显下降并出现蓝移, 这些数据表明 GQDs 与胰蛋白酶作用使胰蛋白酶构象的变化^[19]。

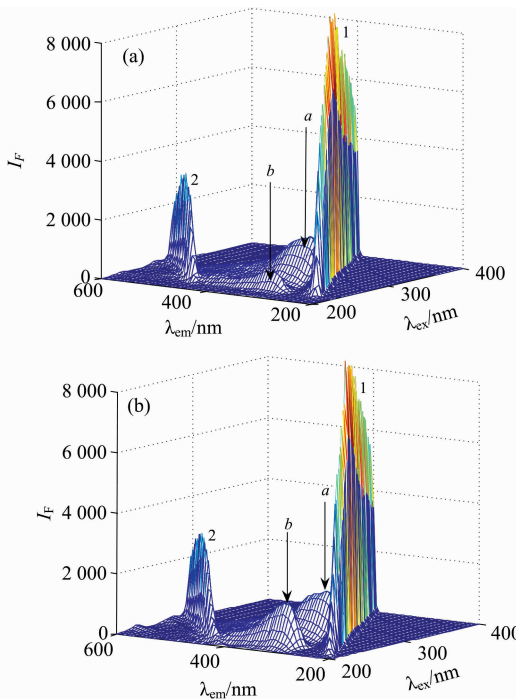


图 3 GQDs 与胰蛋白酶作用的三维荧光图

(a): $c_{\text{Tryp}} = 4.17 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

(b): $c_{\text{Tryp}} = 4.17 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{GQDs}} = 4.17 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 Three dimensional fluorescence spectra of the interaction of GQDs with trypsin

(a): $c_{\text{Tryp}} = 4.17 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

(b): $c_{\text{Tryp}} = 4.17 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{GQDs}} = 4.17 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 GQDs 对胰蛋白酶活性的影响

随着 GQDs 的加入, 胰蛋白酶活性降低, 但不能被完全抑制(图 4, 纵坐标为相对活性)。通过 GQDs 酶活性下降的半抑制浓度 IC_{50} 为 $4.35 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明 GQDs 对胰蛋白酶活性相对较弱的抑制作用。这可能是 GQDs 在酶中有较高的高生物利用度, 胰蛋白酶的活性位点被 GQDs 稳定和保护的^[20]。

2.4 MCR-ALS 解析结果分析

紫外-可见吸收是测定小分子与生物分子相互作用的一种简单而常用的技术。如图 5(a)所示, 胰蛋白酶在大约 215 和 276 nm 处呈现出两个吸收峰, 在 215 nm 处的吸收峰随着

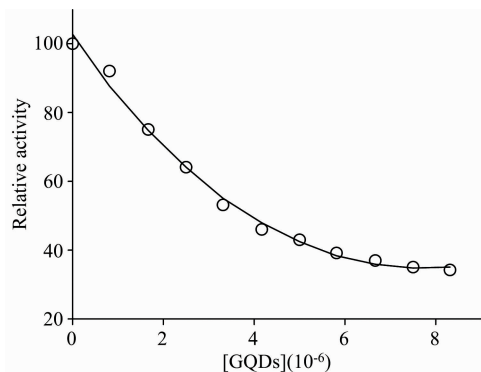


图 4 不同浓度 GQDs 存在下 Tryp 的活性

$c_{\text{Tryp}} = 4.17 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入 GQDs 的浓度为 $0 \sim 8.33 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 间距 $8.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{BAEE}} = 1.67 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 4 The activity of Trypsin in the presence of GQDs

$c_{\text{Tryp}} = 4.17 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, GQDs was added to this solution in the range of $0 \sim 8.33 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with an interval of $8.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the concentration of BAEE was $1.67 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

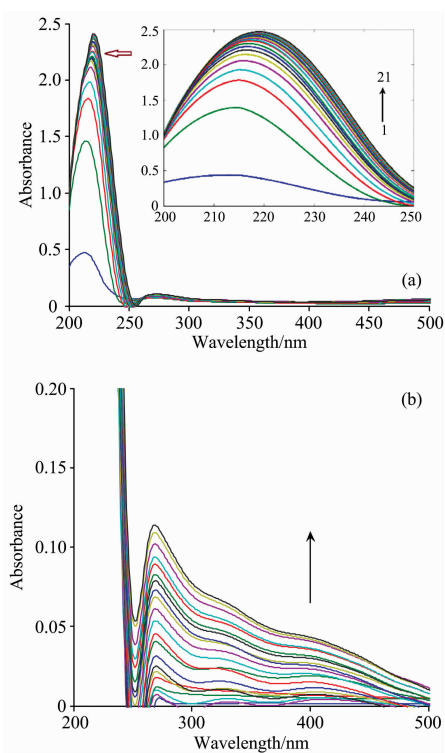


图 5 Tryp 与 GQDs 反应的紫外吸收光谱

(a): (1→21): 固定 Tryp 加 GQDs, $c_{\text{Tryp}} = 1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入 GQDs 的浓度为 $0 \sim 3.33 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 间距 $1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): (1→21): 固定 GQDs 加 Tryp, $c_{\text{GQDs}} = 1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入 Tryp 的浓度为 $0 \sim 2.22 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 间距 $1.11 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 5 The UV-Vis spectra of the interaction of GQDs with trypsin

(a): (1→21): The concentration of Tryp was kept at $1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; GQDs was added to this solution in the range of $0 \sim 3.33 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with an interval of $1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): (1→21): The concentration of GQDs was kept at $1.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tryp was added to this solution in the range of $0 \sim 2.22 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with an interval of $1.11 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

GQDs 的加入逐渐向 220 nm 移动直至平衡, 而在 276 nm 处的吸收峰基本保持不变。从图 5(b)可知, 随着胰蛋白酶的加入, GQDs 的峰强度明显增加, 峰位移不明显。图 5(a)和(b)的光谱重叠严重, 难以区分 GQDs-胰蛋白酶复合物的光谱而无法分析反应过程。通常利用化学计量学扩展多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)可从复杂系统的重叠波谱信号中提取较多的额外信息, 例如组分的浓度分布、纯光谱、特别是确定 GQDs-胰蛋白酶复合物等方面的信息。

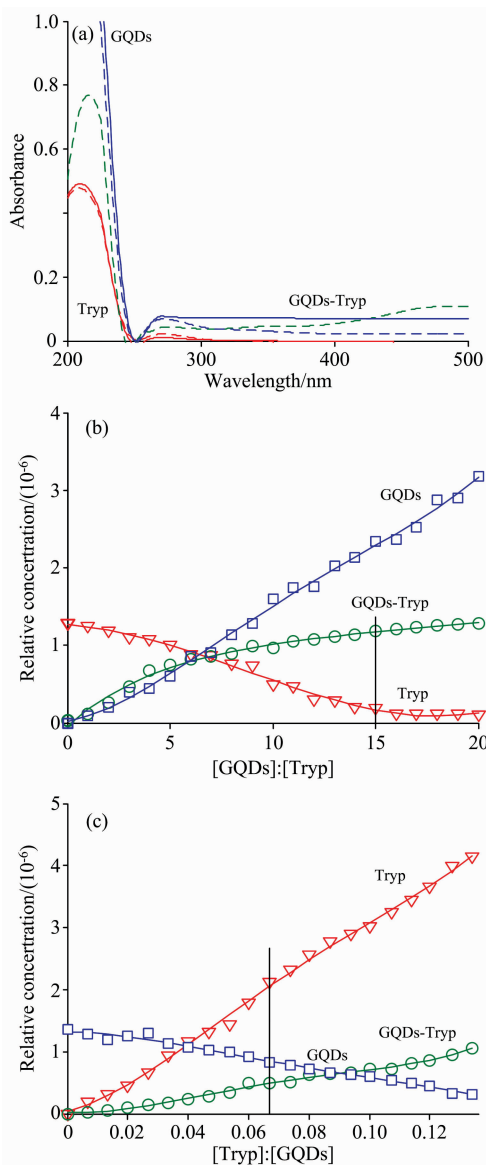


图 6 由 MCR-ALS 解析紫外光谱得到的 GQDs 与胰蛋白酶作用体系光谱图(a)和浓度趋势图(b)和(c)

Fig. 6 Recovered UV-Vis spectra (a) and concentration profiles (b) and (c)

通过实验 5 和实验 6 得到扩展光谱数据矩阵 $[D^{\text{trypsin}}, D^{\text{GQDs}}]$, 然后利用奇异值分解(SVD)方法计算矩阵, 得到与化合物相关重要因子个数, 得到的前 4 个特征值分别为 113.6, 30.7, 10.3 和 1.4, 说明反应体系中有 3 个主要因素

可能与 3 个化合物有关, 分别为胰蛋白酶、GQDs 和 GQDs-胰蛋白酶复合物。MCR-ALS 法提取的胰蛋白酶和 GQDs 的光谱[虚线, 图 6(a)]与实测图(实线)吻合较好。此外, 还得到了 GQDs-胰蛋白酶复合物的紫外-可见吸收光谱(虚线)。计算与实测光谱曲线吻合较好, 说明 MCR-ALS 解析得到的浓度曲线合理可靠。如图 6(b)所示, 随着 GQDs 的加入, GQDs-胰蛋白酶复合物浓度逐渐升高, 同时胰蛋白酶浓度下降, 在[GQDs]:[胰蛋白酶]=15 时, 体系趋于平衡; 从图 6(c)可知, 随着胰蛋白酶的加入, GQDs 浓度呈逐渐下降趋势, GQDs-胰蛋白酶复合物浓度增加直至体系基本平衡。MCR-ALS 法的解析结果为进一步了解 GQDs 与胰蛋白酶相互作用的动力学过程提供了依据, 说明 GQDs 可以与胰蛋白酶相互作用, 并形成 GQDs₁₅-胰蛋白酶复合物。

3 结 论

采用光谱法结合化学计量学方法研究 GQDs 与胰蛋白酶的相互作用。三维荧光光谱法和圆二色谱实验说明 GQDs 的存在不仅改变了胰蛋白酶所处的微环境并使胰蛋白酶的构象发生变化。运用多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)解析扩展光谱数据矩阵, 进一步认识 GQDs 与胰蛋白酶在作用中达到平衡时各组分的状态和整个动态变化过程。而酶活性实验表明 GQDs 会影响胰蛋白酶的活性。该研究从分子水平研究 GQDs 与生物大分子的作用机制, 并为 GQDs 的毒副作用研究提供了有价值的信息。下一步计划研究不同尺寸和层数的石墨烯量子点对生物大分子构象和蛋白酶活性的影响。

References

- [1] Karimzadeh H A, Hasanzadeh M, Shadjou N, et al. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 108: 110.
- [2] Xie Y C, Wan B, Yang Y, et al. *Journal of Environmental Sciences—China*, 2019, 77: 198.
- [3] Rafieerad A R, Bushroa A R, Amiri A, et al. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 360: 132.
- [4] Huang S, Qiu H N, Lu S Y, et al. *Journal of Hazardous Material*, 2015, 285: 18.
- [5] Lu L P, Guo L P, Wang X Y, et al. *RSC Advances*, 2016, 6: 33072.
- [6] McPherson A, Day J, Larson S B. *Crystal Growth & Design*, 2019, 19(5): 2963.
- [7] Mahmodian S, Momeni L, Shareghi B. *Monatshefte Fur Chemie*, 2018, 149(11): 2131.
- [8] Yang B Y, Liu R T, Hao X P, et al. *Biological Trace Element Research*, 2012, 146: 396.
- [9] Kaur G, Tripathi S K. *Spectrochimica Acta A*, 2015, 134: 173.
- [10] Wang Y, Ni Y N. *Analyst*, 2014 39: 416.
- [11] Song W, Yu X X, Hu X X, et al. *Spectrochimica Acta A*, 2015, 137: 286.
- [12] Tauler R, Smilde A K, Kowalski, B R. *Journal of Chemometrics*, 1995, 9: 31.
- [13] Ahmadi G, Tauler R, Abdollahi H. *Analytical Chemistry*, 1991, 63(14): 1425.
- [14] Tu B, Wang Y, Mi R, et al. *Spectrochimica Acta A*, 2015, 149: 536.
- [15] Huang S, Qiu H N, Lu S Y, et al. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 285: 18.
- [16] Bhogale A, Patel N, Mariam J, et al. *Colloids and Surfaces B—Biointerfaces*, 2014, 113: 2764.
- [17] Wang C D, Liu B S, Bian G, et al. *Spectroscopy Letters*, 2018, 51: 311.
- [18] Ding F, Diao J X, Sun Y. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 7218.
- [19] Shecin R F, Saharuddin B M, Noraini B, et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 1711.
- [20] Tabbash T A, Pranjal M Z I, Karadag I, et al. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, 13: 1525.

Interaction Between Graphene Quantum Dots and Trypsin With Spectroscopic and Chemometrics Approaches

ZHANG Qiu-lan, ZHU Zhi, WEN Zi-jian, NI Yong-nian

College of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330031, China

Abstract With super properties, such as photoluminescence properties, edge effect, low cytotoxicity and great biocompatibility, graphene quantum dots (GQDs) have attracted great attention in biological and biomedical applications. The potential toxicity investigations of GQDs still need to involve. Few studies have been illuminated that GQDs could alter the function and structure of trypsin. The molecular interaction between trypsin and GQDs was systematically researched through the combination of multi-spectroscopic and chemometrics approaches. The fluorescence quenching experiment showed that GQDs quench the intrinsic fluorescence of trypsin and inhibit the biological activity of trypsin. When different concentrations of GQDs were added, the fluorescence emission peak intensity of trypsin at 350 nm continuously decreased and had a blue shifted (350 to 344 nm), indicating that GQDs could change the microenvironment of trypsin and increase its hydrophobic. Meanwhile, the higher the concentration of GQDs, the more obvious the change of trypsin fluorescence, indicating that GQDs interacts and changes the secondary structure of the macromolecule. The microenvironment of protein amino acid residues is determined by the conformation of protein molecules. The spiral structure of proteinase decreased from 19.12% to 16.23% in the circular dichroism experiment indicated that the addition of GQDs induced the alteration of the secondary structure of trypsin and relaxed the trypsin framework. The three-dimensional fluorescence further indicated that the conformation of trypsin changed with the addition of GQDs. When the microenvironment of the chromophores of serum albumin changes, its UV-visible absorption spectrum also changes. Due to the complex life system, most of the information in the test of spectrum data is implicit and overlapping. We need to use and develop the effective biological signal collection, transduction, data processing and analysis method to get the useful information that can explain life as much as possible from the measured data. To obtain sufficient and effective chemical information of life, this study adopts the continuous titration technique collecting multidimensional spectrum data. An expanded UV-Vis spectral data matrix was analyzed by the multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) chemometrics approach. To further understand the state and the whole dynamic change process of each component when GQDs and trypsin reached equilibrium in action, the qualitative (spectrum of each component) and quantitative (the changing trend of concentration) information were obtained from the heavily overlapped spectra. The analytical results of MCR-ALS provide a basis for further understanding of the kinetic process of the interaction between GQDs and trypsin, indicating that GQDs can interact with trypsin and form GQDs₁₅-trypsin complex. The results offered insights into the binding mechanism of GQDs with trypsin and significant information for possible toxicity risk of GQDs to human health.

Keywords Spectroscopy; Chemometrics; Graphene quantum dots; Trypsin; Biological activity; Interaction

(Received Aug. 30, 2019; accepted Dec. 26, 2019)