

· 研究论文 ·

拓扑结构聚丙烯酸对蛋白构象及功能的影响

叶安琪¹ 黎哲祺¹ 游世超¹ 陈浩林^{1*} 石毅¹ 刘利新¹ 陈永明^{1,2,3*}

(¹中山大学材料科学与工程学院 聚合物复合材料及功能材料教育部重点实验室 广州 510275)

(²河南大学化学与分子科学学院 开封 475004)

(³河南大学抗病毒性传染病创新药物全国重点实验室 郑州 450046)

摘要 蛋白质二级结构与其生物功能密切相关, 研究聚合物与蛋白相互作用及其调控规律具有重要意义. 线型聚丙烯酸(PAA)可通过与蛋白表面带正电氨基相互作用或诱导构象变化影响蛋白功能, 但不同链拓扑结构PAA对蛋白构象及功能的影响尚缺乏系统研究. 本研究采用“相同拓扑结构下比较分子量、相近分子量下比较拓扑结构”的研究策略, 通过可控聚合反应和点击化学, 合成了一系列不同分子量的线型和分子刷型PAA, 通过圆二色谱(CD)系统考察了聚合物分子量与拓扑结构对蛋白构象及功能的调控作用. 结果表明, 对于低分子量蛋白, 低分子量线型PAA可快速诱导蛋白二级结构由 α -螺旋向 β -折叠转变, 且PAA分子量越高, 构象转变达到平衡所需时间越长. 在相近分子量条件下, 分子刷型PAA较线型PAA可加快低分子量蛋白构象由 α -螺旋向 β -折叠转变; 而对于高分子量蛋白, 线型PAA和刷型PAA影响也很大, 但是与聚合物分子量和拓扑结构的关系不鲜明. 拓扑结构PAA对不同蛋白的功能影响不同. 对于 β -半乳糖苷酶, 刷型PAA可显著稳定其酶活性, 而线型PAA则迅速破坏其酶活性. 对分子量相近但拓扑结构不同的线型与刷型PAA作为模型抗原卵清蛋白(OVA)的佐剂进行了小鼠免疫评价. 结果表明, 线型PAA诱导的OVA特异性IgG滴度及脾细胞干扰素- γ 分泌水平均显著优于分子刷组. 结合体外构象动力学数据推断, 刷型PAA引发的抗原二级结构快速剧烈重塑可能导致关键表位受损, 而线型聚合物介导的温和渐进式构象调控更利于保护功能性表位的完整. 综上, 聚合物分子量、拓扑结构是调控蛋白结构和功能的重要参数.

关键词 高分子拓扑结构; 聚丙烯酸; 聚合物分子刷; 蛋白构象; 佐剂

引用: 叶安琪, 黎哲祺, 游世超, 陈浩林, 石毅, 刘利新, 陈永明. 拓扑结构聚丙烯酸对蛋白构象及功能的影响. 高分子学报, doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2026.26137.

Citation: Ye, A. Q.; Li, Z. Q.; You, S. C.; Chen, H. L.; Shi, Y.; Liu, L. X.; Chen, Y. M. Effects of topological poly(acrylic acid)s on protein conformation and functions. *Acta Polymerica Sinica* (in Chinese), doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2026.26137.

蛋白质在生物系统中发挥着核心作用, 参与催化、信号转导、免疫识别和细胞调控等过程^[1,2]. 近年来, 基于蛋白质的治疗药物和疫苗, 特别是重组蛋白抗原, 因其高特异性和生物活性, 已成为疾病预防和治疗中不可或缺的工具.

然而它们的实际应用常常受到其稳定性差、易降解等问题的限制, 其庞大的分子尺寸和复杂的折叠模式使其在生理和加工条件下也容易发生变性、聚集. 蛋白质的功能与其构象状态密切相关, 而构象的变化则可能导致功能的不确定, 从

生物大分子专题; 2026-04-24收稿, 2026-05-26录用, 网络出版.

基金项目: 国家自然科学基金(基金号 22075324, 82341037).

* 通信联系人, E-mail: chenhl58@mail.sysu.edu.cn; chenym35@mail.sysu.edu.cn

本文附有电子支持信息, 与正文一并刊登在本刊网站(www.gfzxb.org).

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2026.26137; CSTR: 32057.14.GFZXB.2026.7646

而影响蛋白质药物和疫苗的疗效和安全性。另外,蛋白类药物在应用中,还存在靶向性差、难入细胞等问题,严重影响其生物利用度^[3]。因此,研究材料和蛋白的相互作用,调控蛋白构象及功能、提升药物生物利用度,是生物制药领域的重要研究课题^[4,5]。

合成聚合物具有丰富和可调控的结构^[6,7],可通过静电吸引、氢键和亲疏水作用等非共价相互作用来影响蛋白质构象^[8,9],从而稳定其天然结构或诱导可控的构象重排。另外,聚合物材料还可以作为功能性载体^[10,11],调控蛋白质的构象,并对其进行缓释,从而调控蛋白药物体内分布和代谢,并且可作为疫苗佐剂增强抗原蛋白免疫应答功能^[12,13]。在众多合成聚合物中,聚丙烯酸(PAA)结构简单,易于制备,为一种弱聚电解质,具有pH响应性,对蛋白质带正电荷的区域具有强的亲和力,生物相容性优良。该聚合物被用于调控蛋白结构和功能,如Porfiri等^[14]发现聚丙烯酸与 α -淀粉酶复合物能延迟 α -淀粉酶的二级结构破坏,证明聚电解质对酶的结构具有稳定作用。并且,PAA被用来作为疫苗佐剂,通过对蛋白的吸附和缓释增强蛋白抗原的免疫应答功能,被用于肿瘤疫苗、预防疫苗的发展^[15,16]。Garinot等^[17]证实线型聚丙烯酸(SPA09)可将CMV-gB抗原蛋白捕获在聚合物基质中,实现抗原在注射部位的滞留,从而被SPA09招募的树突状细胞摄取,发挥强佐剂效应。但目前报道采用的聚丙烯酸为商业购买的试剂,分子量分散宽,无法深刻阐明精确分子量对蛋白构象和功能的影响。而且,目前研究都是基于无规线团的线型PAA。除了线型结构,聚合物还具有环型、星型、接枝/高度接枝、高度支化等极为丰富的拓扑链结构,改变拓扑结构会显著影响聚合物链的形貌、链缠结等行为,显著影响材料的性能^[18,19]。拓扑结构明确的聚合物在调控蛋白质构象和功能方面的作用研究目前尚为空白。

本研究以聚丙烯酸为模型材料,研究不同分子量和不同拓扑结构PAA对蛋白质构象的调控规律。将聚合物侧链高密度接枝到聚合物主链得到一类称为聚合物分子刷的材料,侧链之间高度体积排斥导致其主链和侧链都被迫延展,是一类典型的拓扑结构聚合物^[20-22]。本工作研究线型、分子刷型2类拓扑PAA对蛋白结构和功能的影

响。首先,通过可控自由基聚合合成3种不同分子量的线型PAA,在相同拓扑结构条件下考察分子量依赖的蛋白构象调控效应;随后,进一步设计并合成与线型PAA分子量相近的分子刷型PAA,用于重点比较“拓扑结构”对蛋白构象及功能的影响。为区分聚合物分子量与拓扑结构对蛋白构象调控的影响,本研究分别在相同拓扑结构下比较不同分子量样品,并在相近分子量范围内比较线型与分子刷型PAA的作用差异,从而解析二者对蛋白结构与功能的独立贡献。研究选取了四种等电点类似、分子量显著差异的模型蛋白质:牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、藻红蛋白(R-PE)和 β -半乳糖苷酶(β -Gal)。以圆二色谱(CD)为主要手段,探究了PAA材料的分子量、拓扑结构对这些蛋白质二级结构(如 α -螺旋、 β -折叠)的影响。进一步,通过 β -Gal酶活性评价及模型抗原OVA小鼠免疫实验,初步分析了聚合物分子量与拓扑结构变化对蛋白功能的影响。研究表明,不同分子量和不同拓扑结构PAA对所研究蛋白的二级结构产生显著的影响,并且对 β -Gal酶活性和OVA免疫原性也产生显著的作用。本研究表明调整聚合物分子量和拓扑结构是调控蛋白结构和功能的有效方式。

1 实验部分

1.1 主要原料

丙烯酸甲酯(MA, 98%)、丙烯酸羟乙酯(HEA, 98%)、丙烯酸叔丁酯(*t*BA, 98%)、4-*N,N*-二甲基氨基吡啶(DMAP, 98%)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, 98%)、五水合硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 98%)、4-戊炔酸(97%)、五甲基二乙烯三胺(PMDETA, 98%)、三(2-(二甲氨基)乙基)胺(Me_6TREN , 99%)、2-溴异丁酸乙酯(EBIB, 99%)、氢氧化钾(98%)、苯甲醚(99%)、超干 N,N -二甲基甲酰胺(DMF, 99%)和藻红蛋白(R-PE)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;中性氧化铝(100~200目)、三氟乙酸(AR)、对甲苯磺酸(TsOH , 99%)和 β -半乳糖苷酶(β -Gal)活性测定试剂盒均购自上海麦克林生化科技股份有限公司;抗坏血酸(AA, 99%)和卵清蛋白(OVA)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;无水乙醚(AR)购自广州化学试剂厂;二甲基亚砜(DMSO)、二氯甲烷(DCM)、碳酸氢

钠(NaHCO_3)、甲醇、无水硫酸钠、正己烷、甲苯、乙酸乙酯和氯化钠均购自广东光华科技股份有限公司, 纯度均为AR. 叠氮化钠(AR)购自西亚化学. β -半乳糖苷酶(β -Gal)购自北京百灵威科技有限公司. 本工作中所使用DCM经氢化钙除水、重蒸后使用. 溴化亚铜(CuBr)用冰醋酸处理后备用. 2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)重结晶处理后备用.

4-氰基-4-(苯基硫代羰基硫代)戊酸(CBPA)参考文献合成^[23]: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, in CDCl_3 , δ): 3.42 (2H, SCH_2CH_2), 2.70 (2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.35~2.60 (2H, CCH_2CH_2), 1.88 (3H, CCH_3), 1.70 (2H, SCH_2CH_2), 1.51 (2H, CH_2CH_3), 0.97 (3H, CH_2CH_3). $\text{N}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ 由 α -溴乙酸和叠氮化钠在水溶液中室温搅拌反应16 h制备: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, in D_2O , δ): 3.82 (2H, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{COOH}$). 炔基官能化的氮氧自由基衍生物: 4-(4-戊炔酰氧基)-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基(ay-TEMPO)通过4-戊炔酸与4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基发生酯化反应制备. 由于自由基的存在会导致 $^1\text{H-NMR}$ 信号的严重宽化, 用苯肼将ay-TEMPO还原为相应的羟胺衍生物进行表征: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, in CDCl_3 , δ): 1.20 (12H, $\text{OCH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_2$), 1.51~2.02 (4H, $\text{OCH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_2$), 5.08 (H, $\text{OCH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_2$), 2.50 (2H, $\text{CHCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$).

所有流式抗体均购自Biolegend公司. IFN- γ 酶联免疫斑点试剂盒购自深圳市达科为生物技术股份有限公司. 胎牛血清(FBS)购自依科赛生物(ExCell Bio)科技股份有限公司. 无菌细胞培养皿和无菌离心管购自广州洁特生物过滤(Jet Biofil)股份有限公司. 牛血清白蛋白(BSA)购自大连美伦生物(MeilunBio)技术有限公司. 双组分底物溶液(用于ELISA)购自北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司. DMEM培养基、1640培养基购自美国Gibco生命科学公司. 所有动物实验均经中山大学伦理委员会批准, 符合中华人民共和国卫生部《动物管理条例》(批准文号: SYSU-IACUC-2025-B1945). 本研究选用的SPF级雌性6~7周龄C57BL/6J鼠购自中山大学实验动物中心. RAW-Blue细胞购自法国InvivoGen公司.

1.2 测试与表征

核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)谱图是在Bruker AVANCE III 400 MHz核磁共振仪测得的, 以

CDCl_3 或 DMSO-d_6 为溶剂, 四甲基硅烷(TMS)为内参. 聚合物的SEC曲线和分子量分布(M_w/M_n)是通过体积排除色谱(SEC)测得的, 仪器配有Agilent 1260 Iso泵, 3根PLgel 5 μm 色谱柱(MIXED-B, MIXED-C, MIXED-D)和Agilent 1260示差检测器, 流动相为含有0.5%的LiBr的色谱纯DMF, 柱温为50 $^\circ\text{C}$. 流动相采用四氢呋喃的PLgel凝胶色谱柱(5 μm 10E5A、5 μm 10E4A和5 μm 10E3A), 柱温为40 $^\circ\text{C}$, 聚苯乙烯为内标. 聚合物溶液进样前采用0.22 μm 的尼龙滤膜进行过滤. 圆二色光谱是在日本JASCO公司J1700型圆二色光谱仪测得的, 以磷酸缓冲盐溶液(PBS, pH=7.4)为溶剂, 测试温度20 $^\circ\text{C}$, 将蛋白质与PAA的混合溶液加入1 mm比色皿, 设定扫描范围为180~300 nm, 扫描速率为50 nm/min, 扫描间隔为1 nm, 记录样品的圆二色谱图(CD). 使用软件分析不同二级结构的比例, 包括 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角以及无规卷曲. 酶活性测试和生物实验中使用的多功能酶标仪是美国BioTeck公司的Synergy 2. 流式细胞仪为美国Agilent公司的NovoCyte 3000. 粒径和Zeta电位测试使用英国Malvern公司ZEN3600型纳米粒度仪.

1.3 线型聚丙烯酸(PAA)的合成

采用超氧铜络合物介导的原子转移自由基聚合(ATRP)合成, ATRP引发剂EBIB (9.6 mg, 0.05 mmol)、MA (6.40 g, 74 mmol)、 CuBr (0.3 mg, 0.002 mmol), Me_6TREN (2.7 mg, 0.012 mmol), 将EBIB、 CuBr 、 Me_6TREN 分别溶在14、20、17 μL DMSO中, 加样过程在手套箱中进行, 加样顺序为MA、DMSO (7 mL)、 Me_6TREN 、EBIB. 聚合后用丙酮沉淀3次, 真空干燥, 得到 PMA_{1440} 、 PMA_{5700} 、 PMA_{12300} . 将上述PMA样品分别溶于THF中, 缓慢加入KOH水溶液, 65 $^\circ\text{C}$ 油浴中回流搅拌5 h, 反应结束减压蒸馏除去THF, 用盐酸中和KOH后, 透析除去KCl, 再用稀盐酸将pH调至2, 甲醇沉淀, 真空干燥, 得到 PAA_{1440} 、 PAA_{5700} 、 PAA_{12300} .

1.4 聚合物主链P(HEA- N_3)的合成

聚合物主链P(HEA- N_3)通过聚丙烯酸羟乙酯(PHEA)的羟基与 $\text{N}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ 的羧基发生酯化反应制得, 具体实验步骤分为两个阶段. 首先, 通过可逆加成-断裂链转移(RAFT)自由基聚合合成3种聚合度的PHEA主链. 以 PHEA_{105} 的合成

例：将单体 HEA (9.28 g, 80.0 mmol)、CBPA (116.6 mg, 0.40 mmol)、AIBN (6.8 mg, 0.04 mmol) 与 9.2 mL 干燥 DMF 加入 Schlenk 聚合管中，搅拌均匀。对反应体系进行 3 次冷冻—抽真空—解冻循环以除去氧气，随后在 60 °C 油浴中反应 4 h 后终止。冷却至室温，打开聚合管使反应淬灭。将反应液在大量的乙醚中沉淀 3 次，所得沉淀经过滤、真空干燥，得到 PHEA₁₀₅。

随后，称取 N₃CH₂COOH (636.3 mg, 6.3 mmol)，加入 3 mL 干燥 DMF 中充分溶解；再加入 EDC (976.5 mg, 6.30 mmol)，体系冷却至 0 °C，缓慢滴加溶于 2.5 mL DMF 的 PHEA₁₀₅ (243.6 mg, 对应羟基 2.10 mmol)。滴加完毕后，体系自然升温至室温，加入 DMAP/TsOH (61.8 mg, 0.21 mmol)，继续搅拌 48 h。反应液用饱和食盐水洗涤 3 次，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤、旋转蒸发浓缩后，在乙醚中沉淀 3 次。所得沉淀经过滤、真空干燥，得到侧基带有叠氮基团的聚合物主链 P(HEA-N₃)₁₀₅。通过改变单体投料比，可得到其他链长的聚合物主链 P(HEA-N₃)₂₁₀ 和 P(HEA-N₃)₄₁₉。

1.5 聚合物侧链 PtBA₅₀-ay 的合成

聚合物侧链 PtBA₅₀-ay 的合成分为 2 步。第一步：在 25 mL 的 Schlenk 聚合管中加入 EBIB (39.0 mg, 0.20 mmol)、tBA (4.11 g, 32 mmol)、5 mL 丙酮、PMDETA (34.7 mg, 0.20 mmol)，对反应体系进行 3 次冷冻—抽真空—解冻循环以除去氧气，最后一次循环，在氮气氛围下加入 CuBr (28.7 mg, 0.20 mmol)，将 Schlenk 瓶解冻至室温，随后在 60 °C 油浴中进行聚合反应。为了确保 PtBA 链末端活性、保证较窄的分子量分布，在聚合时将 tBA 转化率控制在 40% 以内。3 h 后，在转化率为 32 % 时停止反应。混合液用 DCM 稀释后，旋转蒸发浓缩除去 DCM、丙酮，用体积比为 7:3 的甲醇:水溶液沉淀 3 次，真空干燥，得到 1.4 g 聚(叔丁基丙烯酸酯) (PtBA₅₀)。

第二步：在 25 mL Schlenk 聚合管中加入上述 PtBA₅₀，ay-TEMPO (50.4 mg, 0.2 mmol)、Me₆TREN (50.6 mg, 0.22 mmol)、1.2 mL 甲苯、1.2 mL 二甲基亚砜，对反应体系进行 3 次冷冻—抽真空—解冻循环以除去氧气，最后一次循环，在氮气氛围下加入 CuBr (31.5 mg, 0.22 mmol)，将 Schlenk 瓶解冻至室温，随后在室温反应 2 h。

混合液用 DCM 稀释后，用 100~200 目的中性氧化铝柱除去铜，接着用体积比 1:1 的甲醇:水溶液沉淀 3 次，真空干燥，得到 1.1 g 的 PtBA₅₀-ay。

1.6 聚丙烯酸分子刷的合成

通过 CuAAC 反应，合成了 PHEA-g-PtBA 聚合物分子刷，以 PHEA₁₀₅-g-PtBA₅₀ 的合成为例。向干燥的 Schlenk 瓶中加入 PtBA₅₀-ay (289.5 mg, 0.0504 mmol)、PHEA₁₀₅-N₃ (8.4 mg, 0.0004 mmol)、CuSO₄·5H₂O (2.5 mg, 0.01 mmol) 及 DMF (1.2 mL)，同时加入 120 μL 苯甲醚作为内标。溶液经 3 次冷冻—抽真空—解冻循环以除去氧气。在最后一次循环中，于氮气氛围下快速加入抗坏血酸 (17.8 mg, 0.10 mmol)。反应在 50 °C 下进行 5 h，取 10 μL 反应前后的溶液测 SEC，计算侧链接枝率。随后经中性氧化铝柱纯化，并在体积比为 7:3 的甲醇:水溶液中沉淀 3 次，真空干燥后得到侧链为 PtBA 的聚合物分子刷。最后，在三氟乙酸 5 倍过量的情况下反应 24 h，将叔丁酯水解为羧基，反应后用碳酸氢钠调 pH=7，在水中透析 24 h，冷冻干燥得到 PAA 分子刷。

1.7 聚丙烯酸对蛋白构象的影响研究

质量比的影响：探究不同 PAA 和蛋白质质量比对蛋白质二级结构影响。固定蛋白浓度为 0.4 mg/mL，调整 PAA₁₄₄₀ 浓度使 PAA 与蛋白质质量比为 PAA₁₄₄₀:OVA = 1.25:1、2.5:1、5:1、10:1、20:1，PAA 与蛋白质均使用 10 mmol/L 磷酸缓冲盐溶液 (PBS, pH=7.4) 作为溶剂。将 OVA 蛋白溶液滴加到 PAA₁₄₄₀ 溶液中等体积混合，室温 (20 °C) 搅拌 30 min。随后将混合溶液加入到 1 mm 比色皿，设定扫描范围为 180~300 nm，扫描速率为 50 nm/min，扫描间隔为 1 nm，记录样品的 CD 谱图。使用软件 CDNN2.1 对 195~260 nm 波长区的数据进行分析，计算样品中 α-螺旋、β-折叠等蛋白二级结构的相对含量。

时间的影响：固定蛋白质浓度为 0.4 mg/mL，PAA 浓度 8 mg/mL，PAA 与蛋白质质量比为 20:1，PAA 与蛋白质均使用 PBS 作为溶剂。将蛋白质滴加到 PAA 的 PBS (pH=7.4) 溶液中等体积混合，室温 (20 °C) 搅拌，监测不同时间点的二级结构的变化。将蛋白质与 PAA 的混合溶液加入 1 mm 比色皿，设定扫描范围为 180~300 nm，扫描速率为 50 nm/min，扫描间隔为 1 nm，记录样品的 CD 谱图。使用软件 CDNN2.1 对 195~260 nm 波长区

间的数据进行分析, 计算样品中蛋白二级结构的相对含量.

1.8 聚丙烯酸材料与OVA复合物动态光散射及Zeta电位测定

OVA浓度为0.4 mg/mL, PAA材料浓度为8 mg/mL, PAA与OVA质量比为20:1, PAA与蛋白质均使用10 mmol/L PBS (pH=7.4)作为溶剂. 将蛋白质滴加到PAA的PBS溶液中等体积混合, 室温(20 °C)搅拌5 h, 随后将混合溶液分别加入到1 cm比色皿和电位样品池, 测定样品的粒径和Zeta电位. 每个样品重复测定3次, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n=3$)表示.

1.9 聚丙烯酸对 β -半乳糖苷酶活性测定

首先将 β -Gal和6种PAA材料分别溶解于10 mmol/L PBS缓冲液中, 随后, 将PAA溶液与酶溶液按质量比20:1混合. 将混合后的样品置于室温(20 °C)条件下搅拌, 分别在12和24 h 2个时间点取样, 用于酶活性测定. 酶活性的测定采用酶标法, 以邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)为底物. 通过检测特定波长下产物邻硝基苯酚(ONP)的生成速率, 计算出 β -Gal酶活性, 并与未添加PAA的 β -Gal酶对照组进行比较, 评估PAA对酶活性的影响.

1.10 聚丙烯酸对OVA抗原蛋白体内免疫研究

免疫和评价方案: 采用6~7周龄、体重15~20 g的SPF级雌性C57BL/6J小鼠. 将浓度为8 mg/mL的PAA溶液与0.4 mg/mL的OVA溶液(PAA与OVA均溶于PBS中), 按1:1等体积混合制备PAA+OVA复合物, 混合液中OVA终浓度为0.2 mg/mL, 聚丙烯酸终浓度为4 mg/mL, 持续搅拌5 h. 以铝佐剂+OVA作为对照组. 初次免疫时, 小鼠于尾根部皮下注射100 μ L PAA+OVA复合物, 每只小鼠含OVA 20 μ g; 初次免疫后第14天和第28天分别重复上述注射流程进行加强免疫, 以强化免疫应答.

小鼠体液免疫检测: 在初次免疫后的第14天、第28天和第42天采集小鼠血清, 使用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测OVA特异性IgG抗体滴度. 抗体滴度的变化趋势可以反映机体对OVA抗原的体液免疫应答强度和持久性.

小鼠细胞免疫检测: 第42天处死小鼠并摘取脾脏, 用于后续细胞免疫应答分析. 采用酶联免疫斑点试验(ELISpot)检测脾细胞中分泌干扰

素- γ (IFN- γ)的细胞数量, 以此反映辅助型T细胞1型(Th1型)细胞免疫应答水平. 将分离制备好的脾细胞接种至预先包被抗IFN- γ 抗体的ELISpot板上, 随后加入相应抗原对细胞进行刺激, 置于细胞培养箱中持续孵育48 h, 以诱导抗原特异性T细胞分泌IFN- γ . 实验设置 3×10^5 个/孔的细胞浓度, 实验组每孔加入5 μ g OVA, 阳性对照组与阴性对照组均采用 1×10^5 个/孔的细胞浓度, 阳性对照组每孔加入5 μ g阳性刺激物. 刺激48小时后, 使用AEC底物试剂盒(BD Biosciences)使斑点可视化, 并用自动ELISpot读数器计数. 此外, 采用流式细胞术检测细胞活化标志物. 无菌分离第42天小鼠的脾脏淋巴细胞, 经组织研磨、红细胞裂解等步骤制备单细胞悬液, 随后将细胞悬液与抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗B220、抗CD69等一系列荧光标记特异性抗体进行染色, 通过流式细胞术分析脾脏中不同淋巴细胞亚群的活化状态, 全面评价PAA材料作为佐剂对细胞免疫应答的调控作用.

1.11 统计学分析

所有实验均独立重复3次, 数据以“平均值 \pm 标准差($\text{mean} \pm \text{SD}$)”表示. 使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析. 2组间比较采用双尾 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)并结合Tukey's post hoc test进行差异分析. 显著性水平设定为* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2 结果与讨论

2.1 线型PAA的合成与表征

为了对比PAA分子量和拓扑结构对蛋白构象及功能的影响, 先合成了3种线型PAA, 旨在考察分子量依赖的构象调控效应.

线型PAA的合成路线如图1所示. 首先采用超氧铜络合物介导的ATRP合成了3种不同聚合度的线型聚丙烯酸甲酯(PMA). 表1总结了3种PMA样品聚合条件、单体转化率及聚合度表征结果. 图2(a)展示了所得PMA样品的体积排除色谱(SEC)流出曲线, 3个样品PMA₁₄₄₀、PMA₅₇₀₀和PMA₁₂₃₀₀均呈现对称的单峰分布, 分子量分布窄($M_w/M_n < 1.18$). 图2(b)、2(c)和2(d)分别为3个样品的¹H-NMR谱图, 主链的亚甲基(2H, CH₂CHCOOCH₃)和次甲基质子(H, CH₂CHCOOCH₃)分别出现在 $\delta =$

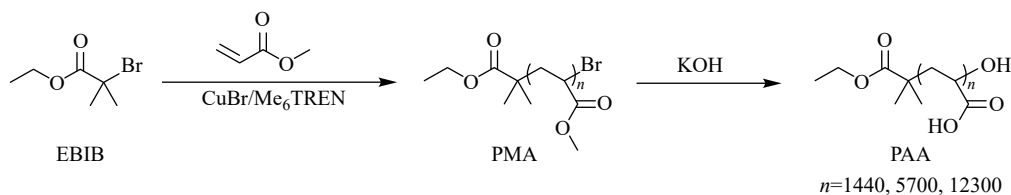


Fig. 1 Synthesis route and characterization of linear PAA.

Table 1 Condition and Properties of linear PMA synthesized via ATRP.

Sample	[MA]: [EBIB]	Time (h)	Conversion ^a (%)	DP ^a
1	1500	48	96	1440
2	7500	48	76	5700
3	15000	96	82	12300

^a Evaluated from ¹H-NMR spectra.

2.00~1.50 之间, 甲氧基质子(-OCH₃)共振峰出现在 $\delta=3.67$, 证明 3 种不同聚合度 PMA 的成功合成. 在碱性条件下水解 PMA 前体, 得到目标产物 PAA. 在图 2(b)~2(d) 所示水解产物 ¹H-NMR 谱图中, 可以观察到 $\delta=3.67$ 处信号(-OCH₃)消失,

证明 PMA 被水解定量转化为 PAA. 这些结果证实了成功合成了一系列分子量不同的线型 PAA 聚合物. PMA 和 PAA 的分子量及分布汇总在表 2 中.

2.2 聚合物刷主链 P(HEA-N₃) 的合成与表征

聚合物刷主链 P(HEA-N₃) 的合成路线如图 3 所示. 首先, 通过 RAFT 制备了 3 种不同聚合度 (DP=105、210 和 419) 的 PHEA. 随后, 采用酯化反应将叠氮乙酸(N₃CH₂COOH) 接枝到 PHEA 主链的侧基羟基上. 图 4(a) 展示了合成的 3 种 PHEA 主链及其叠氮基官能化产物 P(HEA-N₃) 的 SEC 曲线, 可以观察到所有样品的 SEC 图谱均显示出窄的对称洗脱峰, 分子量分布 (M_w/M_n) 小于 1.18 (表 3), 表明 RAFT 过程及叠氮化修饰具有良好

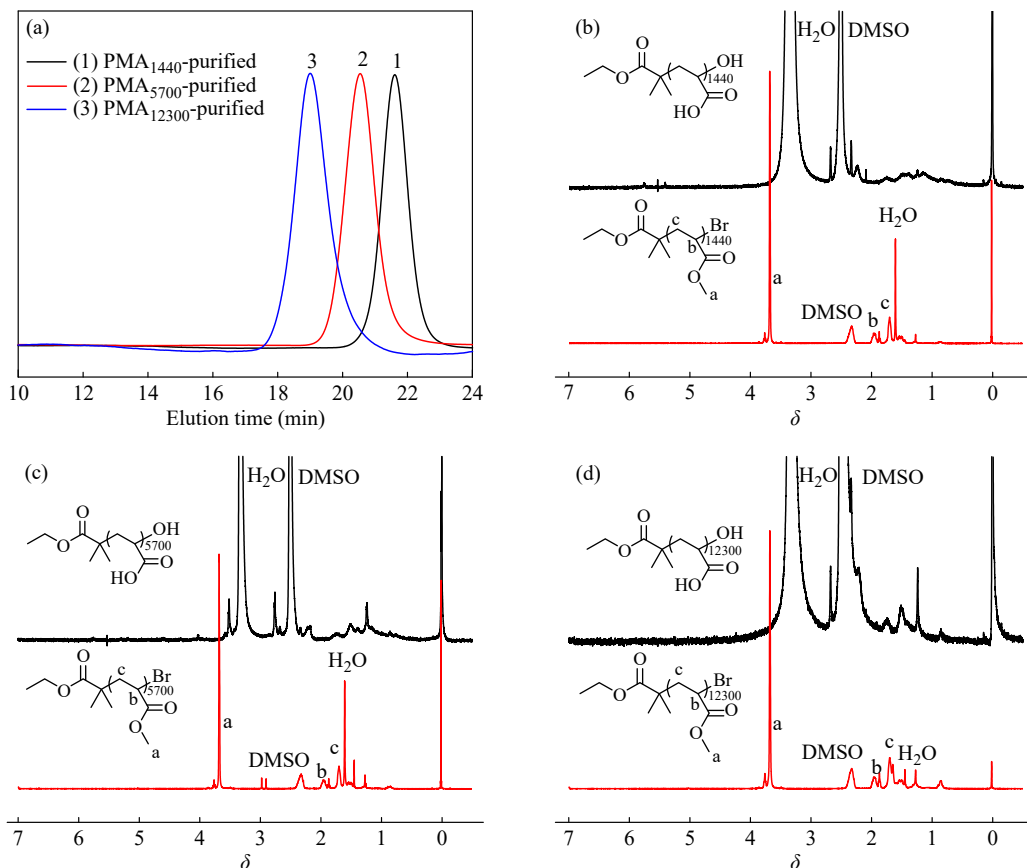


Fig. 2 Characterization of linear PMA and PAA. (a) SEC analysis for the synthesis of PMA₁₄₄₀, PMA₅₇₀₀, and PMA₁₂₃₀₀; ¹H-NMR spectra of (b) PMA₁₄₄₀ and PAA₁₄₄₀, (c) PMA₅₇₀₀ and PAA₅₇₀₀, (d) PMA₁₂₃₀₀ and PAA₁₂₃₀₀. PMA using CDCl₃ as the solvent. PAA using DMSO-d₆ as the solvent.

Table 2 Characterization of linear PMA, PAA and PHEA-g-PtBA, PHEA-g-PAA molecular bottlebrushes.

Sample	$M_{n,theory}^a$ (kDa)	$M_{n,SEC}^b$ (kDa)	M_w/M_n^b	$M_{n,theory}^c$ (kDa) (after hydrolysis)
Linear polymers	PMA ₁₄₄₀	124	257.9	103.7
	PMA ₅₇₀₀	490.4	539.8	410.4
	PMA ₁₂₃₀₀	1058	1511.2	885.6
Molecular bottlebrushes	PHEA ₁₀₅ -g-PtBA ₅₀	628.5	251.7	368.7
	PHEA ₂₁₀ -g-PtBA ₅₀	1283.9	377.2	752.4
	PHEA ₄₁₉ -g-PtBA ₅₀	2588.5	543	1501.3

^a Linear PMA: determined from MA monomer conversion by ¹H-NMR. Molecular bottlebrushes: determined from grafting efficiency of PHEA-g-PtBA₅₀ by SEC (RI) calibrated with polystyrene standards in DMF; ^b Linear PAA: determined by SEC (RI) calibrated with polystyrene standards in THF. Molecular bottlebrushes: determined by SEC (RI) calibrated with polystyrene standards in DMF; ^c Linear PAA: estimated from $M_{n,theory}$ of PMA assuming 100% of transformation. Molecular bottlebrushes: estimated from $M_{n,theory}$ of PHEA-g-PtBA assuming 100% of transformation.

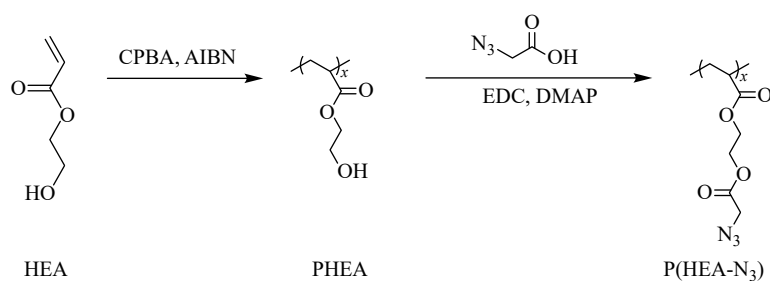
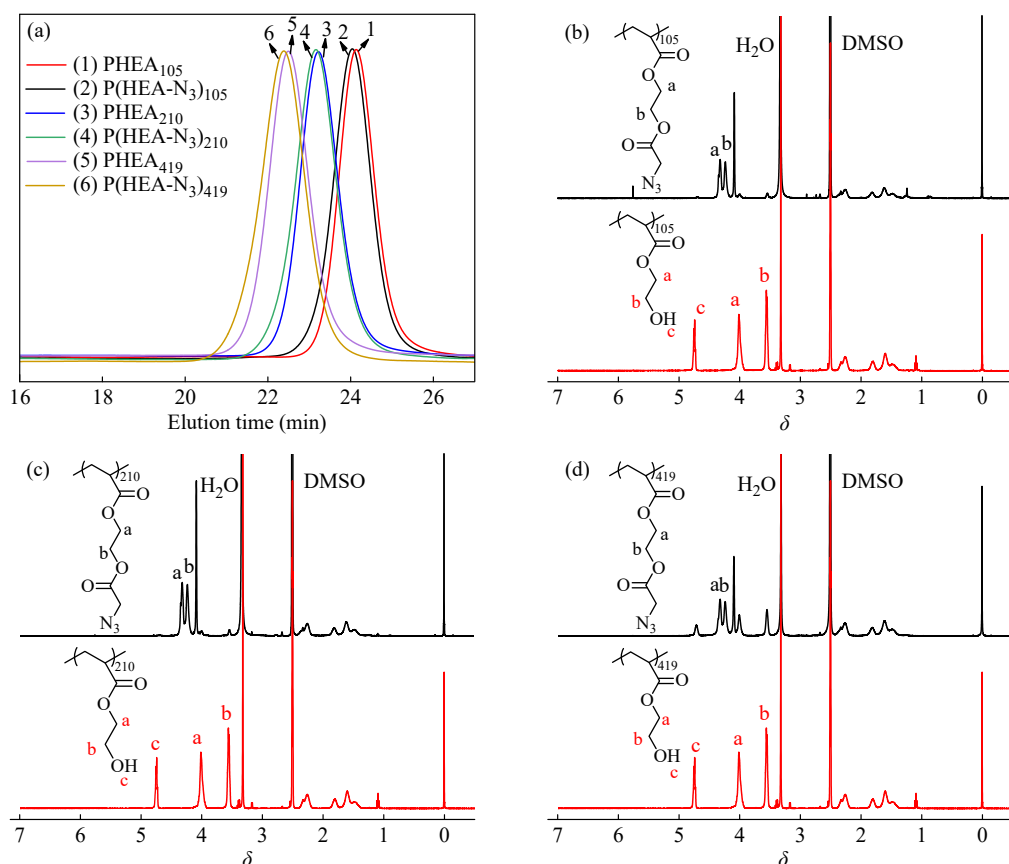
**Fig. 3** The synthesis route to P(HEA-N₃).**Fig. 4** The characterization of PHEA and P(HEA-N₃). (a) SEC traces of PHEA and P(HEA-N₃); ¹H-NMR analysis of (b) PHEA₁₀₅ and P(HEA-N₃)₁₀₅, (c) PHEA₂₁₀ and P(HEA-N₃)₂₁₀, (d) PHEA₄₁₉ and P(HEA-N₃)₄₁₉, using DMSO-d₆ as the solvent.

Table 3 Characterization of PHEA and P(HEA-N₃).

Samples	M_n^a (kDa)	M_w/M_n^a
PHEA ₁₀₅	42.5	1.11
PHEA ₂₁₀	77.8	1.12
PHEA ₄₁₉	131.5	1.14
P(HEA-N ₃) ₁₀₅	44.7	1.12
P(HEA-N ₃) ₂₁₀	83.8	1.14
P(HEA-N ₃) ₄₁₉	146.9	1.18

^a Determined by SEC calibrated with polystyrene (PS) standards in DMF.

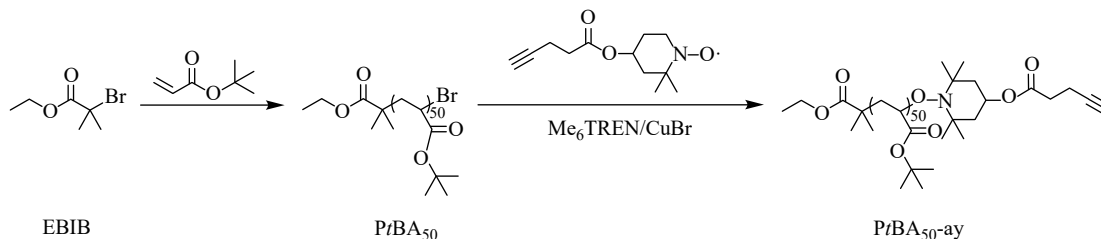
的可控性, 并形成了分子量分布窄的 PHEA 和 P(HEA-N₃)均聚物.

3种 PHEA 样品及其叠氮基官能化产物的 ¹H-NMR 分析如图 4(b)~4(d)所示, 可以观察到, 在 $\delta=4.02$ (2H, CH₂CH₂OH)和 $\delta=3.56$ (2H, CH₂CH₂OH) 的共振峰归属于 PHEA (红线)羟乙基侧链上 2 个亚甲基氢; 在 $\delta=4.75$ (H, CH₂CH₂OH)为羟基 (-OH)质子共振信号. 这些特征质子信号之间的积分比与理论值相符, 证实 PHEA₁₀₅、PHEA₂₁₀、

PHEA₄₁₉成功合成. 对于合成 PHEA-N₃ 聚合物主链, 通过图 4(b)~4(d)中 ¹H-NMR 谱图(黑线)可以观察到在 $\delta=4.02$ 和 3.5 原归属于 HEA 部分的 2 个亚甲基氢峰 H_{a,b} (图 4(b)~4(d), 黑线)基本消失, $\delta=4.75$ 处羟基信号也消失, 而在 $\delta=4.25$ 处出现 2 个峰, 分别为乙基亚甲基共振峰. 同时, 在 $\delta=4.08$ 处出现 1 个单峰, 这是新引入的亚甲基峰 (N₃CH₂). 这些结果清楚地证实了 PHEA 主链侧基已成功修饰为叠氮基团, 得到结构明确 P(HEA-N₃)聚合物.

2.3 聚合物侧链 PtBA-ay 的合成与表征

聚合物侧链 PtBA-ay 的合成路线如图 5 所示. 首先, 以 EBIB 为引发剂, 通过 ATRP 合成了聚合度为 50 的低分散聚(叔丁基丙烯酸酯) (PtBA₅₀). SEC 曲线(图 6(a))表明得到的 PtBA₅₀ 聚合物分子量分布较窄, 聚合可控性较好. 如图 6(b)的 ¹H NMR 谱图(黑线)所示, 在 $\delta=1.50$ (-C(CH₃)₃)处观察到 tBA 重复单元的侧链叔丁基质子, 证实了 PtBA₅₀ 合成.

**Fig. 5** Synthesis route to PtBA₅₀-ay.

为了实现后续的点击化学接枝, 对 PtBA₅₀ 末端溴原子进行了炔基官能化修饰. 具体而言, 在 Me₆TREN/CuBr 催化体系下, PtBA₅₀ 末端溴与 ay-TEMPO 之间发生自由基偶联反应, 将 ay-TEMPO 共价连接到 PtBA₅₀ 链末端, 得到炔基官能化聚合物 PtBA₅₀-ay. 与 PtBA₅₀ 前体相比, PtBA₅₀-ay 的 SEC 图谱(图 6(a))仍保持了窄分子量分布. PtBA₅₀ 和 PtBA₅₀-ay 的分子量及其分布汇总于表 4. 另外, 通过 ¹H-NMR (图 6(b))可以观察到, 在 $\delta=5.14$ 处出现 TEMPO 结构中氮杂六元环的次甲基特征峰, $\delta=1.12$ 处出现归属于 TEMPO 环上的 4 个甲基 (-C(CH₃)₂)特征峰. 这些数据确认了炔基化反应的成功进行, 为后续的铜催化叠氮-炔基加成(CuAAC)反应奠定了基础.

2.4 聚丙烯酸分子刷的合成与表征

铜催化叠氮-炔基加成是合成聚合物分子刷

的高效反应^[24,25]. 通过 CuAAC 反应, 将上述合成的炔基封端 PtBA₅₀-ay 侧链接枝到聚合度不同的叠氮官能化 P(HEA-N₃)主链(聚合度 DP 分别为 105、210 和 419)上(图 7). 控制炔基和叠氮投料比为 1.2:1, 在 50 °C 下反应 5 h. 反应前后的 SEC 如图 8(a)~8(c)所示. 结果表明, 点击反应后所有 PHEA-g-PtBA₅₀ 样品的洗脱峰相对于原始 P(HEA-N₃)主链均显著向更短洗脱时间移动, 说明接枝产物分子量得到大幅增加. 同时, 未反应过量 PtBA₅₀ 侧链对应的峰强度显著降低, 证实了侧链在接枝过程中被有效消耗.

采用 SEC 计算侧链接枝效率. 以苯甲醚为内标, 对 SEC 峰面积进行归一化进行定量分析. 接枝效率的计算基于反应前后 SEC 色谱图中 PtBA₅₀-ay 侧链和内标的相对峰面积. 设 x_1 和 y_1 分别代表反应前混合物中 PtBA₅₀-ay 侧链和苯甲醚

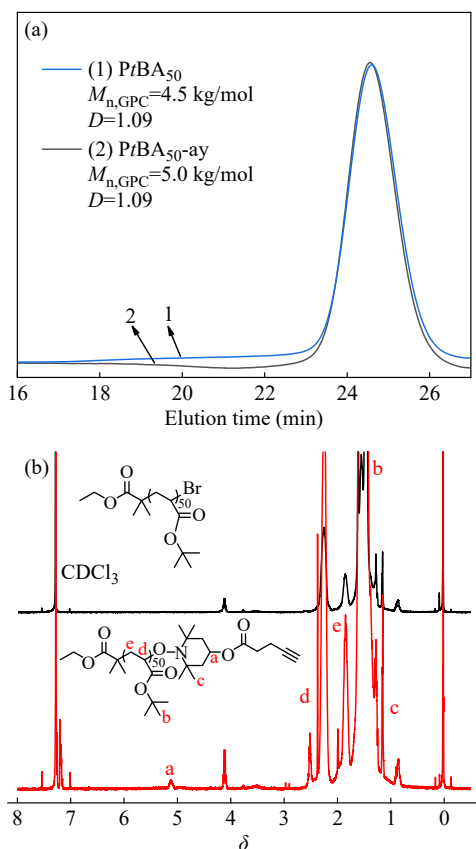


Fig. 6 (a) SEC traces and (b) $^1\text{H-NMR}$ spectra (using CDCl_3 as the solvent) of PtBA_{50} and $\text{PtBA}_{50\text{-ay}}$.

Table 4 SEC characterization of PtBA_{50} and $\text{PtBA}_{50\text{-ay}}$.

Sample	M_n^a (kDa)	M_w/M_n^a
PtBA_{50}	4.5	1.09
$\text{PtBA}_{50\text{-ay}}$	5.0	1.09

^a Determined by SEC calibrated with PS standards in THF.

的流出峰面积, x_2 和 y_2 分别为反应后的 $\text{PtBA}_{50\text{-ay}}$ 侧链和苯甲醚的峰面积. 计算方式如公式(1):

$$\text{侧链消耗率(即接枝率)} = \left(\frac{x_1 - x_2}{y_1 - y_2} \right) / \frac{x_1}{y_1} \quad (1)$$

通过计算可得 $\text{PHEA}_{105\text{-g-PtBA}_{50}}$ 、 $\text{PHEA}_{210\text{-g-PtBA}_{50}}$ 和 $\text{PHEA}_{419\text{-g-PtBA}_{50}}$ 的接枝率分别为 92%、94% 和 95% (表 5). 3 种 PHEA-g-PtBA_{50} 聚合物分子刷的分子量分布较窄, M_w/M_n 分别为 1.14、1.17 和 1.18. 未反应 $\text{PtBA}_{50\text{-ay}}$ 侧链通过反复沉淀进行分离纯化.

通过 $^1\text{H-NMR}$ 谱确认了所得 PHEA-g-PtBA_{50} 分子刷的化学结构 (图 8(d)~8(f), 黑线). 以 $\text{PHEA}_{105\text{-g-PtBA}_{50}}$ 为例 (图 8(d), 黑线), 该氢谱可清晰区分 PHEA 主链与 PtBA_{50} 侧链的特征质子信号. 其中 PHEA 主链上原本与酯键相邻的亚甲

基质子, 在叠氮与炔基经 CuAAC 反应形成三唑杂环后, 化学位移偏移至 $\delta=4.25$ 处, 证明共价接枝反应成功发生. 此外, 归属于 PtBA_{50} 侧链的叔丁基甲基特征峰, 稳定出现在 $\delta=1.50$ 处. 类似地, 图 8(e) 和 8(f) (黑线) 证明 $\text{PHEA}_{210\text{-g-PtBA}_{50}}$ 和 $\text{PHEA}_{419\text{-g-PtBA}_{50}}$ 的高效合成. 为了获得目标 PAA 分子刷, 使用相对于叔丁酯基团 5 倍摩尔过量的三氟乙酸将 PtBA 侧链水解为聚丙烯酸链. 反应结束后, 用饱和碳酸氢钠溶液将溶液 pH 值调节至 7, 在水中透析 24 h, 冷冻干燥得到 PAA 分子刷. 如 8(d)~8(f) 中 $^1\text{H-NMR}$ 谱图 (红线) 所示, 叔丁基的特征单峰 ($\delta=1.50$) 消失, 证实了 PtBA 侧链的水解. 这些结果表明, PtBA 侧链定量转化为 PAA 侧链, 生成了结构明确的 PAA 分子刷.

所有合成 PHEA-g-PtBA 和 PHEA-g-PAA 样品的分子量、分子量分布汇总在表 2 中. 表中 $M_{n,\text{theory}}$ 和 $M_{n,\text{SEC}}$ 结果不一致, 这是由于后者是通过相对于线型聚苯乙烯标样测定的相对分子量. 值得注意的是, 以上合成的刷型 $\text{PHEA}_{105\text{-g-PAA}_{50}}$ 的理论分子量与线型 PAA_{5700} 的理论分子量相近、刷型 $\text{PHEA}_{210\text{-g-PAA}_{50}}$ 的理论分子量与线型 PAA_{12300} 的理论分子量相近, 这为我们后面讨论相同分子量、不同拓扑结构 PAA 的功能带来便利.

2.5 线型聚丙烯酸与蛋白质量比对蛋白质二级结构影响

为探究不同 PAA 和蛋白质量比对蛋白质二级结构的影响, 固定 OVA 蛋白质浓度为 0.4 mg/mL, 调整 PAA_{1440} 浓度使其与 OVA 质量比从 1.25:1 逐渐增加到 20:1. 将蛋白质滴加到 PAA 的 10 mmol/L PBS 溶液中等体积混合, 室温 (20 $^{\circ}\text{C}$) 搅拌 30 min 后监测蛋白质二级结构的变化. 通过改变 PAA_{1440} 与卵清蛋白 OVA 的质量比, 研究了聚合物浓度对蛋白质二级结构的影响. 结果表明 (电子支持信息图 S1, 表 6), 随着 PAA_{1440} 与 OVA 质量比从 1.25:1 逐渐增加到 20:1, OVA 中 α -螺旋结构的含量呈持续下降趋势, 而 β -折叠含量则相应逐步增加. 这种变化趋势表明, PAA 浓度的增加显著扰乱了 OVA 分子原有链构象, 促进了 α -螺旋结构解旋, 向 β -折叠结构转变. 较高浓度 PAA 对 OVA 二级结构的扰动作用更强, 造成的结构变化也更显著. 这是由于大量羧基基团和蛋白分子结构中各种基团之间的相互作用所致.

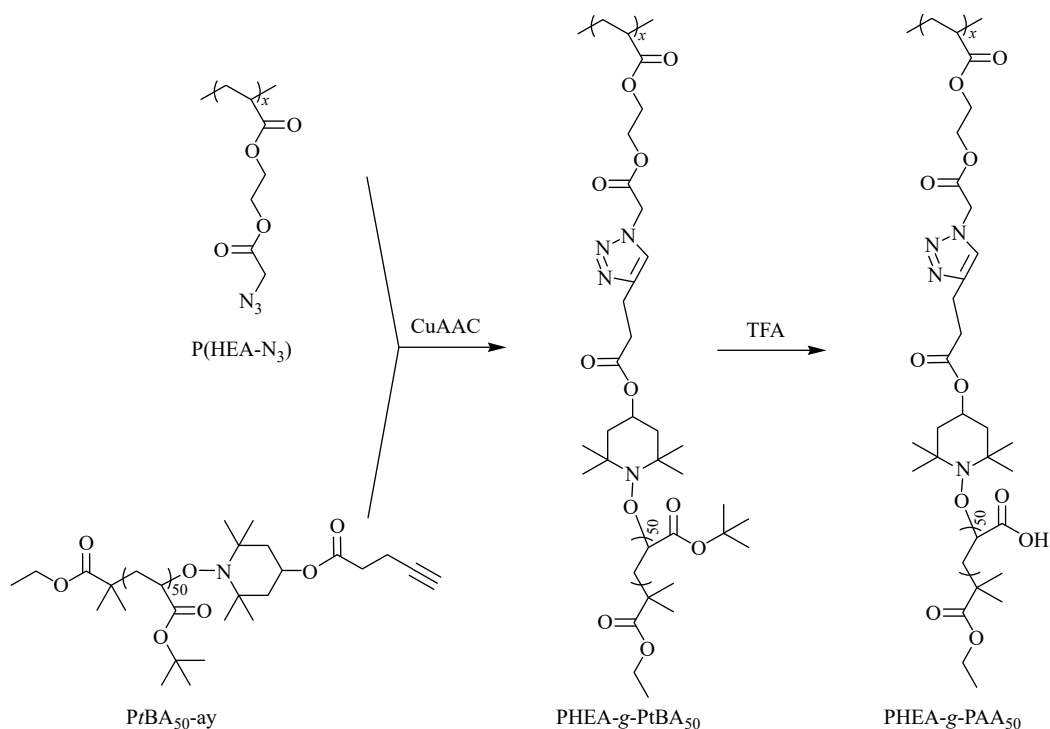


Fig. 7 Synthesis route to PHEA-g-PAA₅₀.

2.6 拓扑结构聚丙烯酸与蛋白质复合物动力学分析

为研究PAA材料分子量及拓扑结构对蛋白质二级结构动态转变的调控动力学,选择4种模型蛋白:卵清蛋白(OVA, 45 kDa, $pI=4.5$)、牛血清白蛋白(BSA, 66.4 kDa, $pI=5.3$)、 β -半乳糖苷酶(β -Gal, 118 kDa, $pI=5.0$)和R-藻红蛋白(R-PE, 240 kDa, $pI=4.3$).它们具有相近的等电点,但分子量差异显著.利用CD光谱表征了这4种模型蛋白与6种不同类型的PAA材料混合后,其二级结构随时间的变化.

首先,检测了每种蛋白质稳定性.在48 h内,4种游离蛋白质的 α -螺旋与 β -折叠相对含量无明显变化,证实在实验条件下保持良好的构象稳定性.当加入质量比为20:1的聚合物时,通过CD谱图表征结果计算蛋白构象的变化,总体来说6种PAA材料对四种蛋白质二级结构均造成显著的变化(图9).随孵育时间增加,蛋白质二级结构中 α -螺旋比例都先是迅速降低,然后逐渐达到平衡,而 β -折叠的比例则相应增加,呈现一致的构象转变趋势.

不同分子量、不同拓扑结构聚合物表现出不同的影响动力学,对不同蛋白也有不同的影响.对于线型PAA,低分子量PAA(如PAA₁₄₄₀)对低

分子量OVA和BSA蛋白的 α -螺旋影响要大于高分子量PAA(如PAA₁₂₃₀₀)(图9(a)和9(c)).低分子量线型PAA可在短时间内大幅破坏 α -螺旋骨架,而分子量越高, α -螺旋解离动力学越迟缓,达平衡所需孵育时间越长.对于高分子量 β -Gal和R-PE蛋白,构象变化与线型PAA分子量无明显规律性关系(图9(e)和9(g)).值得注意的是,在OVA与BSA体系中,3种不同主链长度的分子刷PAA均可在数小时内诱导其 α -螺旋近乎完全解旋,对OVA和BSA蛋白 α -螺旋解离速度远远高于线型PAA作用,以至于几乎观察不到不同分子量聚合物刷的行为差异(图9(a)~9(d)).类似,分子刷对 β -Gal和R-PE构象影响差异也不明显(图9(e)~9(h)).

α -螺旋作为蛋白质天然构象中典型的刚性二级结构,主要依靠分子内氢键稳定,这是蛋白质维持天然生物活性和完整空间构象的关键结构基础.在 $pH=7.4$ 时,PAA的COOH基本电离为COO⁻,而四种蛋白中游离胺基被质子化为NH₃⁺.当蛋白质分子与PAA材料接触时,PAA材料大量COO⁻与蛋白质分子NH₃⁺形成较强的电荷作用,同时破坏蛋白结构中氢键,双重作用会导致 α -螺旋结构逐渐解旋和拉伸.因此,随着孵育时间的延长,二级结构中 α -螺旋的比例下降至达到平衡.相反, β -折叠结构的含量则随时间逐渐

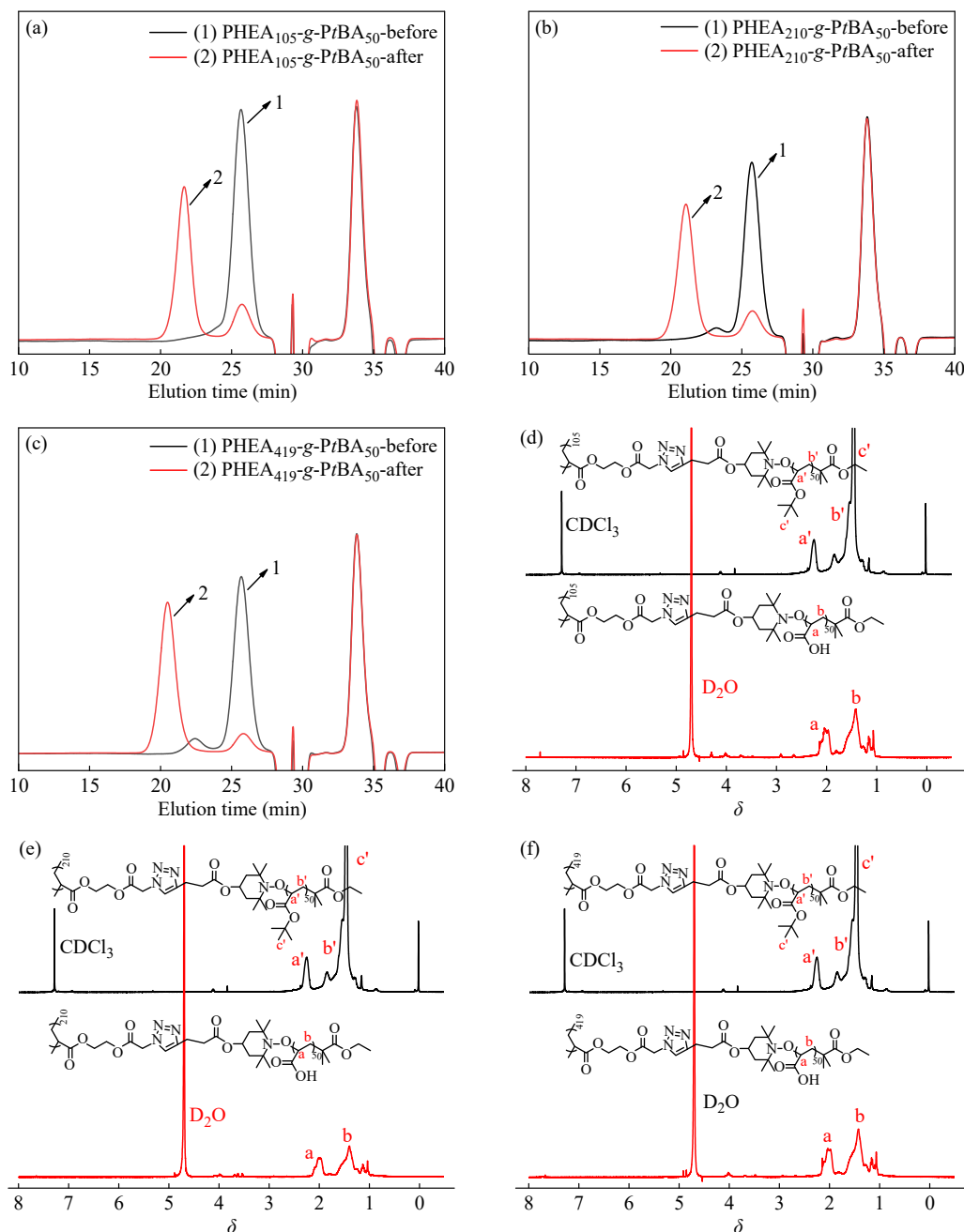


Fig. 8 Characterization of poly(acrylic acid) molecular bottlebrushes. SEC traces of (a) PHEA₁₀₅-g-PtBA₅₀ before and after the CuAAC reaction, (b) PHEA₂₁₀-g-PtBA₅₀ before and after the CuAAC reaction, (c) PHEA₄₁₉-g-PtBA₅₀ before and after the CuAAC reaction. ¹H NMR analysis of (d) PHEA₁₀₅-g-PtBA₅₀ and PHEA₁₀₅-g-PAA₅₀, (e) PHEA₂₁₀-g-PtBA₅₀ and PHEA₂₁₀-g-PAA₅₀, (f) PHEA₄₁₉-g-PtBA₅₀ and PHEA₄₁₉-g-PAA₅₀. PHEA-g-PtBA₅₀ using CDCl₃ as the solvent. PHEA₄₁₉-g-PAA₅₀ using D₂O as the solvent.

Table 5 Characterization of PHEA-g-PtBA molecular bottlebrushes.

Sample	Grafting efficiency ^a (%)
PHEA ₁₀₅ -g-PtBA ₅₀	92
PHEA ₂₁₀ -g-PtBA ₅₀	94
PHEA ₄₁₉ -g-PtBA ₅₀	95

^a Determined by SEC calibrated with PS standards in DMF.

Table 6 Percentage of secondary structures of OVA in presence of PAA₁₄₄₀ at different mass ratios. The complexes were prepared by adding OVA protein solution dropwise into PBS solution of PAA₁₄₄₀ measured after 30 min.

Sample	OVA	PAA ₁₄₄₀ :OVA mass ratio				
		1.25:1	2.5:1	5:1	10:1	20:1
α -Helix	3	14.4%	13.7%	12.6%	9.0%	1.3%
β -Sheet	33.9%	38.9%	40.9%	43.4%	54.1%	76.8%

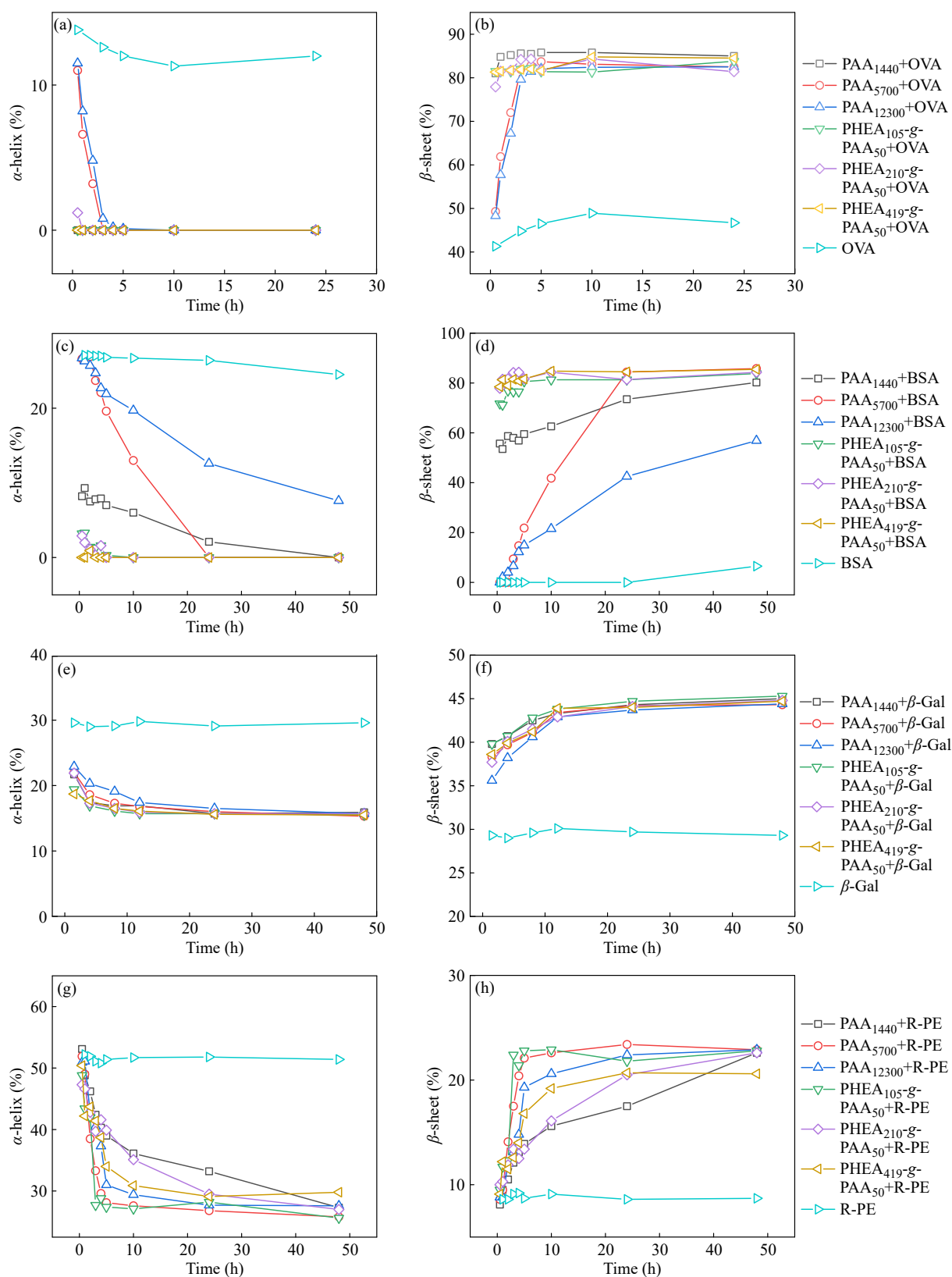


Fig. 9 Kinetic evolution of α -helix and β -sheet contents in four model proteins during incubation with six different PAAs (mass ratio 20:1), characterized by CD spectroscopy. (a, c, e, g) Dynamic changes in α -helix content of OVA, BSA, β -Gal, and R-PE, respectively, over the incubation period. (b, d, f, h) Corresponding dynamic changes in β -sheet content of the four proteins. OVA was monitored for 24 h, while BSA, R-PE, and β -Gal were monitored for 48 h. The experiments were conducted in 10 mmol/L PBS at room temperature (20 °C).

增加. 这种结构转变源于 α -螺旋解旋后蛋白质多肽链的重折叠和有序排列. 在聚合物影响下, 相邻肽段之间形成新的分子间氢键, 促进 β -折叠结构组装. 低分子量PAA (如PAA₁₄₄₀)构象变化灵活, 易于迅速建立有效作用点, 对较低分子量的OVA 和 BSA 蛋白构象影响更快; 而高分子量PAA (如PAA₁₂₃₀₀)构象变化相对慢, 对OVA 和 BSA 蛋白构象影响就慢. 而刷型PAA侧链构象为被迫伸展, 表面存在高密度的羧酸根, 易迅速破坏蛋白原有氢键, 作用动力学更快. 但是, β -Gal 和 R-PE 分子量高达 20×10^5 Da, 结构更为复杂, 聚合物羧酸根与蛋白结构中的质子化胺基和氢键作用会更多受到各种动力学过程影响, 对不同分子量和拓扑结构聚合物的作用表现出不规律的行为.

进一步分析了低分子量和高分子量蛋白对PAA拓扑结构响应差异的可能原因. 与单体蛋白相比, 寡聚蛋白(如四聚体或六聚体)因亚基间的相互作用更加稳定, 通常表现出更高的结构刚性和抗变性能力^[26]. 在本研究中, 4种模型蛋白不仅分子量不同, 其固有寡聚状态也存在差异: β -Gal以四聚体形式存在, R-PE为结构更复杂的异源六聚体, 而OVA 和 BSA 在天然条件下为单

体蛋白. 我们推测, 寡聚状态和结构致密性的差异可能是导致它们对PAA诱导构象变化敏感性各异的重要原因. 具体而言, 对于OVA 和 BSA 等单体蛋白, 由于缺乏亚基间约束, 其二级结构可能更易被PAA链接近, 因而在刷型PAA存在下可发生快速的构象转变. 对于 β -Gal 和 R-PE 这类寡聚蛋白, 其固有的四聚体或六聚体结构能够缓冲局部的结构扰动, 从而降低二级结构变化的速率. 此外, 寡聚状态还可能调控表面电荷分布和表位可接近性, 这进一步解释了本研究中所观察到的蛋白构象转变.

2.7 聚丙烯酸与OVA复合物粒径及Zeta电位分析

为进一步阐明不同拓扑结构PAA与蛋白质的相互作用模式, 以OVA为模型蛋白, 通过粒径仪分析了线型和分子刷型PAA分别与OVA形成复合物的粒径分布及表面电荷特性. 如图10(a)中Z均粒径结果显示, 在相同复合条件下, 两类PAA与OVA形成的复合物粒径在500~1500 nm范围. 图10(b)中Zeta电位测试表明, OVA 蛋白表面带弱负电, 与2种PAA复合后, 体系Zeta电位均显著负移. 上述结果表明不同分子量和拓扑结构PAA与OVA均形成了表面为负电性的颗粒

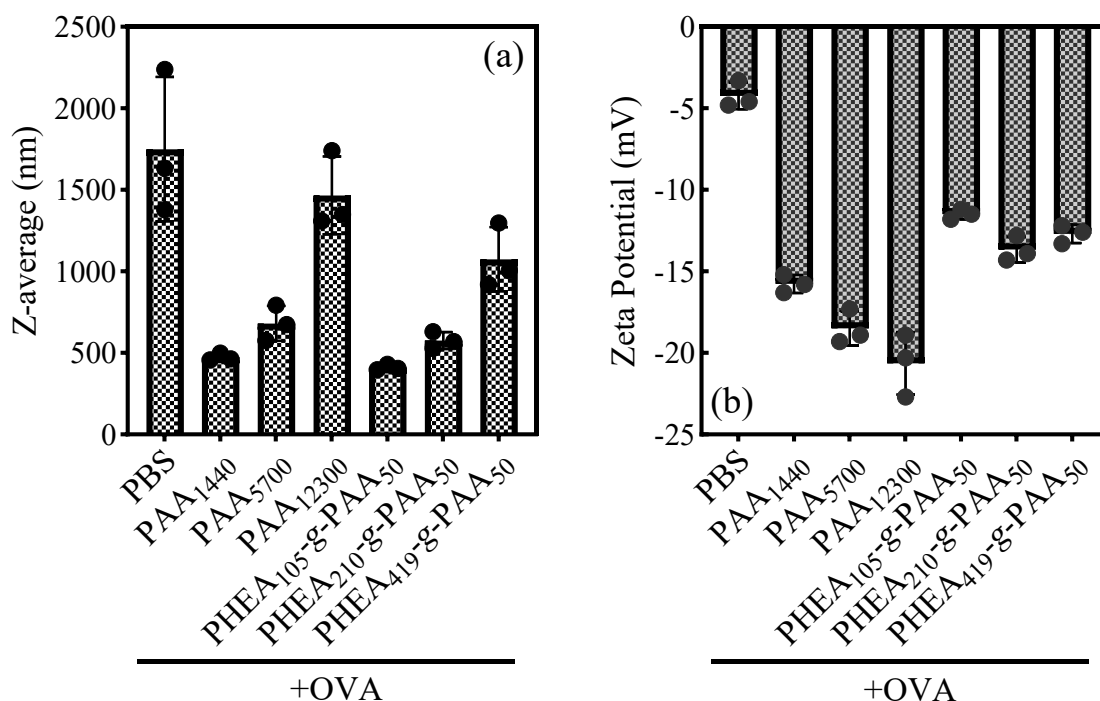


Fig. 10 Characterization of (a) size and (b) Zeta potentials of PAA+OVA complexes. PAA and OVA were mixed at a mass ratio of 20:1 in 10 mmol/L PBS at 20 °C. Data are presented as mean \pm SD ($n=3$).

复合物.

2.8 β -Gal 酶活性测定分析

β -Gal 是一种大分子量的四聚体酶, 被广泛用作分子生物学中的报告分子, 其活性对构象变化高度敏感. 在此, 我们评估不同链拓扑结构的 PAA 材料对 β -Gal 酶活性的影响, 为探究材料调控酶活性的途径. 所有活性测定均在室温下于 PBS 中进行. 将 β -Gal 单独孵育, 以及 β -Gal 与各种 PAA 材料的混合物分别在室温下搅拌 12 和 24 h, 通过 ONPG 标准比色法测定游离 β -Gal 和与不同 PAA 材料混合的 β -Gal 的相对酶活性, 结果如图 11 所示. 对于单独 β -Gal 对照组, 随着搅拌时间的延长, 酶活性逐渐降低. 12 h 后, 活性降至初始值的约 55%, 24 h 后进一步降至约 31%. 这表明, 酶在实验条件下也会发生一定的活性损失, 这可能是由于催化反应中酶结构逐渐变化所致. 当 β -半乳糖苷酶与线型 PAA 材料 (PAA₁₄₄₀、PAA₅₇₀₀ 和 PAA₁₂₃₀₀) 孵育时, 其相对酶活性显著降低. 孵育 24 h, β -Gal 的酶活性几乎完全丧失. 这是由于线型 PAA 与 β -Gal 之间的相互作用所致. 与之形成鲜明对比的是, 3 种 PAA 分子刷保持了 β -Gal 酶活性. 对于主链最短的分子刷 (PHEA₁₀₅-g-PAA₅₀), 12 h 后酶活性保持在初始值 95% 以上, 24 h 后仍保持在 50%. 对于较长主链分子刷 (PHEA₂₁₀-g-PAA₅₀ 和 PHEA₄₁₉-g-PAA₅₀), 活性保留率略低, 但仍显著高于线型 PAA.

以上现象展现了拓扑结构 PAA 对蛋白功能显著的影响. 线型 PAA 链为柔性构象, 更易渗透

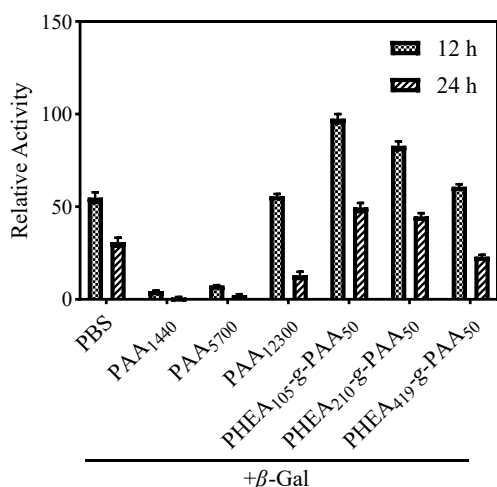


Fig. 11 β -Gal activity assay. PAA and β -Gal were mixed at a mass ratio of 20:1 in 10 mmol/L PBS at 20 °C. Data are presented as mean \pm SD ($n=3$).

到 β -Gal 的活性位点, 破坏维持酶天然构象的分子内氢键和疏水相互作用, 影响了其活性位点. 相比之下, PAA 分子刷为相对刚性的构象, 阻止了其羧酸根基团接近酶活性位点. 同时, 分子刷与酶表面非催化中心官能团的相互作用有助于维持 β -Gal 的天然构象^[27,28], 从而保持较高的酶活性.

2.9 聚丙烯酸+OVA 体内免疫效果研究

线型聚丙烯酸已经被报道用于蛋白抗原的佐剂^[17,29]. 为了评估不同拓扑结构 PAA 材料在体内的佐剂功能, 设计了小鼠免疫方案(图 12(a)所示), 每只小鼠尾根部注射 PAA+OVA 复合物 (400 μ g PAA 和 20 μ g OVA), 并按照初免、2 次加强免疫程序分别于第 0、14 和 28 天进行免疫. 在初免后第 14、28 和 42 天采集血液样本, 并于第 42 天分离脾脏细胞, 用于分析体液和细胞免疫反应. 考虑到聚合物对 OVA 构象变化影响差异大以及动物体内复杂的环境, 这里我们选择线型 PAA₅₇₀₀ (410.4 kDa) 和刷型 PHEA₁₀₅-g-PAA₅₀ (368.7 kDa) 以及线型 PAA₁₂₃₀₀ (885.6 kDa) 和刷型 PHEA₂₁₀-g-PAA₅₀ (752.4 kDa) 两组 PAA 材料. 每组对聚合物分子量水平相近, 仅分子拓扑结构存在区别. 在前面结果中, 线型 PAA₅₇₀₀ 以及 PAA₁₂₃₀₀ 对 OVA 二级结构转变影响缓慢, 而刷型 PHEA₁₀₅-g-PAA₅₀ 以及 PHEA₂₁₀-g-PAA₅₀ 对 OVA 则影响快速, 这有助于评价 PAA 拓扑结构在体内对 OVA 免疫诱导的影响. 设置 3 个对照组, 分别为 PBS 空白对照组、游离 OVA 单独抗原组以及铝佐剂 Al 联合 OVA 对照组 (Al+OVA).

在免疫不同时间采样, 采用 ELISA 定量检测血清中 OVA 特异性 IgG 抗体滴度(图 12(a)). 如图 12(b) 结果显示, 所有 PAA 免疫组以及 Al+OVA 组的 OVA 特异性 IgG 抗体滴度均从第 14 天到第 42 天逐渐且持续升高. 具体而言, 免疫后第 14 天与第 28 天, 所有组别抗体整体水平相对降低, 不同拓扑 PAA+OVA 免疫组及对照 Al+OVA 组之间抗体水平无统计学显著差异, 提示在初次免疫与首次加强阶段, 各组尚未形成稳定分化的特异性免疫应答. 至第 42 天, 各组体液免疫水平出现差异. 所有 PAA+OVA 佐剂免疫组及 Al+OVA 组均较游离 OVA 单独免疫组出现极显著上调. 传统铝佐剂可一定程度提升 OVA 特异性抗体水平. 在分子量相当、但不同拓扑结构 PAA 中,

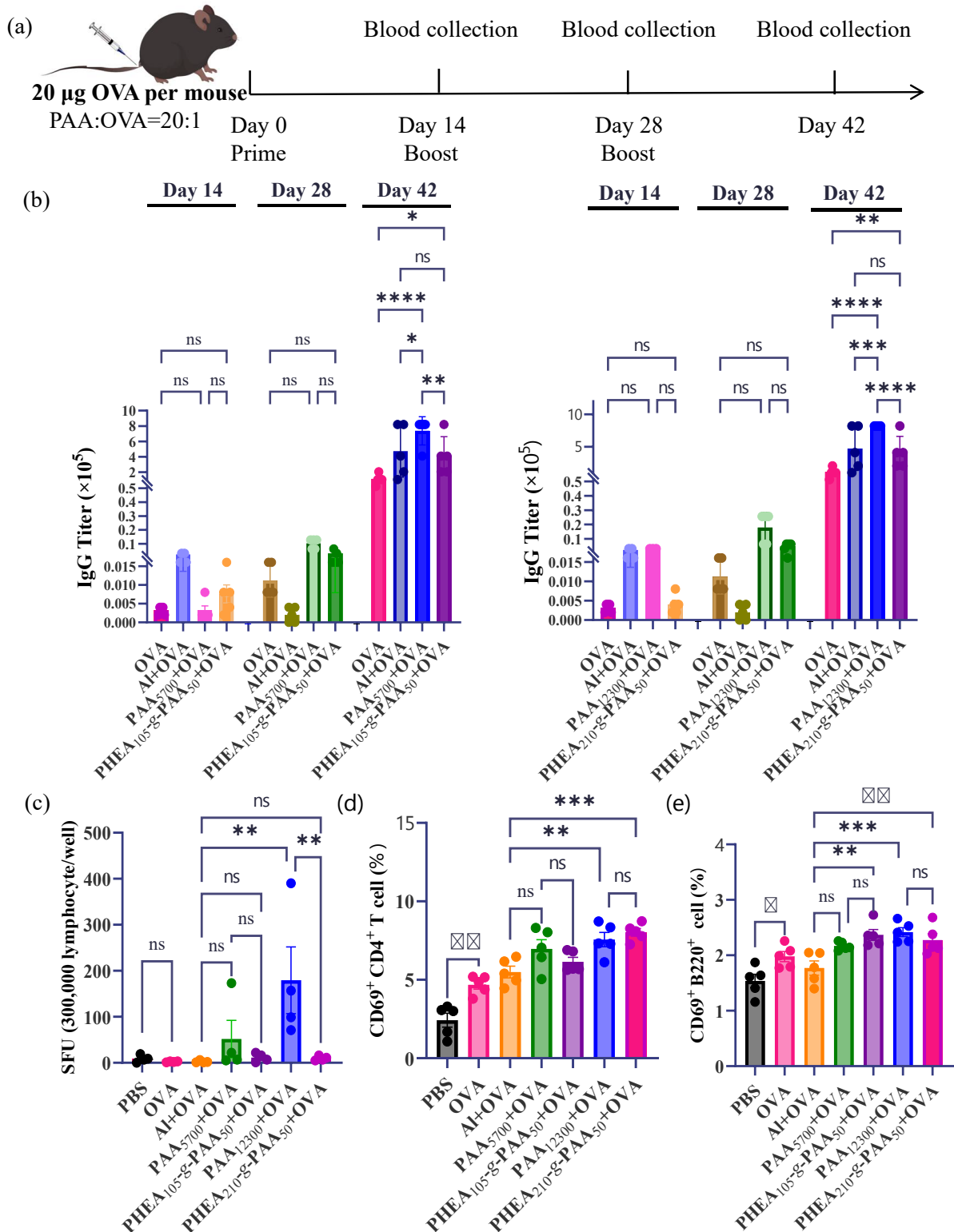


Fig. 12 Animal Experiments. (a) Immunization schedule based on the PAA+OVA immunized mouse model ($n=5$); (b) ELISA analysis of serum IgG antibody titers on days 14, 28, and 42 ($n=5$); (c) Statistical analysis of IFN- γ secretion by 300000 splenic lymphocytes after stimulation with OVA using ELISpot assay (SFU: spot forming units) ($n=4$); (d) Flow cytometry analysis of the percentage of CD69 $^{+}$ CD4 $^{+}$ effector T cells in splenic lymphocytes harvested from mice on day 42 post-immunization ($n=5$); (e) Flow cytometry analysis of the percentage of CD69 $^{+}$ B220 $^{+}$ cells in splenic lymphocytes harvested from mice on day 42 post-immunization ($n=5$). Statistical significance was calculated using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, ns: not significant.

线型PAA的体内佐剂活性优于刷型结构, 线型PAA₅₇₀₀以及PAA₁₂₃₀₀可触发最强效的IgG应答, 显著高于分子量相近的PHEA_{105-g-PAA₅₀}以及PHEA_{210-g-PAA₅₀}.

IFN- γ 是一种关键细胞因子, 在介导炎症反应和促进T细胞活化中发挥核心作用. 为了表征PAA+OVA复合物诱导的细胞免疫反应, 在免疫后第42天从小鼠中分离脾细胞, 并采用ELISpot法检测IFN- γ 的分泌水平. 如图12(c) ELISpot所示, AI+OVA组轻微提升IFN- γ 的分泌水平, 相较阴性对照无统计学差异, 是传统铝佐剂的弱点. 线型PAA₁₂₃₀₀免疫组斑点形成单位数量显著上调, 为所有组别中最高水平, 展现最强的激活细胞免疫效果. 其余PAA+OVA免疫组相较对照组存在一定活化提升, 但组间差异无统计学显著性.

采用流式细胞术对淋巴细胞活化情况进行了进一步分析. CD69是淋巴细胞的早期活化标志物, 其表达上调表明淋巴细胞已被有效活化, 并进入增殖和分化阶段. 如图12(d)和12(e)所示, 与AI+OVA组相比, 线型PAA₁₂₃₀₀和刷形PHEA_{210-g-PAA₅₀}中CD69⁺CD4⁺T细胞、CD69⁺B220⁺B细胞的比例均显著升高, 整体佐剂活性优于铝佐剂组别. 不过各PAA+OVA免疫组之间无显著统计学差异. 该结果符合免疫学一般规律, CD69作为瞬时高表达的早期活化标志, 主要在抗原初次刺激后24~72 h内上调, 并在效应/记忆期迅速回落至本底. 第42天终末期采集的脾脏细胞已完成效应分化与稳态归巢, 因此各组CD69表达无显著差异, 这也从侧面证实了PAA材料的佐剂活性未导致机体免疫系统的非特异性持续异常激活, 展现了良好的生物安全性特征.

综合上述体液与细胞免疫结果可知, 聚合物拓扑结构对免疫应答存在差异化调控规律. 线型PAA整体佐剂性能优于刷型, 其中高分子量线型PAA₁₂₃₀₀诱导的综合免疫应答强度最优. 在T细胞与B细胞早期活化层面, 线型与刷型PAA均展现优异激活能力, 二者效果差距微弱. 结合前

述蛋白构象变化解释如下, 对于低分子量蛋白(如OVA), 刷型PAA诱导了快速且显著的 α -螺旋向 β -折叠转变. 我们推测, 这种剧烈的构象重塑可能破坏了关键功能表位的空间排布. α -螺旋的减少与 β -折叠的增加可能改变了表位区域的局部微环境: 螺旋结构的丧失可能导致某些需要特定螺旋构象才能维持的表位发生解体; 而 β -折叠含量的增加可能促进分子间氢键的形成, 进而干扰构象依赖性抗体的识别. 这些变化共同作用, 可能损害了B细胞或T细胞表位的完整性, 从而降低了刷型PAA存在下OVA的免疫原性. 相比之下, 线型PAA诱导的构象转变更为温和. 我们推测, 这种较为平缓的构象调控更有利于保留蛋白质的天然折叠状态, 可能维持了功能性表位的三维结构, 最终表现出高水平的持续性体液免疫与持久细胞免疫效能. 实验观察到的体内较高IgG滴度, 与这一解释是一致的.

3 结论

通过可控自由基聚合和点击化学合成了不同聚合度的线型PAA和具有不同主链长度的PAA分子刷, 并从拓扑结构角度研究了PAA对几种蛋白二级结构、酶活性和OVA蛋白抗原免疫应答等方面的影响. 研究表明, PAA分子量和拓扑结构都会显著降低所研究4种蛋白质的 α -螺旋结构、增加 β -折叠含量. 尤其是对于低分子量的蛋白, PAA分子刷比线型PAA具有更强的作用而很快破坏 α -螺旋结构, 同时增加 β -折叠含量. 对 β -Gal酶活性测定表明, 线型PAA导致 β -Gal酶活性急剧下降, 几乎在24 h内完全丧失. 相比之下, PAA分子刷由于空间位阻效应, 能够维持一定的酶活性. 在小鼠体内免疫评估表明, 线型PAA比刷型PAA能够诱导OVA抗原更强的抗体滴度和细胞免疫. 综上所述, 本研究表明聚合物链拓扑结构可显著影响蛋白的二级结构及其功能, 通过调控PAA的拓扑结构和分子量, 可更理性设计和应用聚合物材料于准确调控蛋白的功能.

REFERENCES

- 1 Arad, E.; Jelinek, R. Catalytic amyloids. *Trends Chem.*, **2022**, 4(10), 907–917.
- 2 Greenblatt, J. F.; Alberts, B. M.; Krogan, N. J. Discovery and significance of protein-protein interactions in health and disease. *Cell*, **2024**, 187(23), 6501–6517.

- 3 何苏宁, 刘赛, 张婷婷, 史林启, 马如江. 基于动态共价键的纳米载体用于蛋白质药物递送的研究进展. *高分子学报*, **2025**, 56(8), 1293–1312.
- 4 Le, S. P.; Krishna, J.; Gupta, P.; Dutta, R.; Li, S. L.; Chen, J. H.; Thayumanavan, S. Polymers for disrupting protein-protein interactions: where are we and where should we be? *Biomacromolecules*, **2024**, 25(10), 6229–6249.
- 5 孙颖, 王伟杰, 姚焰, 刘青青, 陈鱼, 毛晓卉, 朱丽萍, 朱美芳. 高分子材料在蛋白分离应用中的研究进展. *高分子学报*, **2025**, 56(8), 1313–1332.
- 6 Romio, M.; Trachsel, L.; Morgese, G.; Ramakrishna, S. N.; Spencer, N. D.; Benetti, E. M. Topological polymer chemistry enters materials science: expanding the applicability of cyclic polymers. *ACS Macro Lett.*, **2020**, 9(7), 1024–1033.
- 7 Gomez, D. C.; Seth, S.; Mondal, R.; Koehler, S. J.; Baker, J. G.; Plate, C.; Anderson, I. C.; Smith, M. R.; Gloriod, J.; Gunter, M.; Welborn, V. V.; Deshmukh, S. A.; Figg, C. A. Tuning polyacrylate composition to recognize and modulate fluorescent proteins. *Angew. Chim. Int. Ed.*, **2026**, 65(2), e20032.
- 8 Davis, H. C.; Posey, N. D.; Tew, G. N. Protein binding and release by polymeric cell-penetrating peptide mimics. *Biomacromolecules*, **2022**, 23(1), 57–66.
- 9 Karla, S.; Sorci, M.; Moussa, B.; Banik, R.; Petersen, P. B.; Plawsky, J.; Belfort, G. Hydrogen bonds and electrostatics drive adhesion of polar proteins to hydrophilized polymer membranes. *J. Colloid Interface Sci.*, **2026**, 701, 138530.
- 10 Karabasz, A.; Bzowska, M.; Szczepanowicz, K. Biomedical applications of multifunctional polymeric nanocarriers: a review of current literature. *Int. J. Nanomed.*, **2020**, 15, 8673–8696.
- 11 Ahmad Bhawani, S.; Husaini, A.; Ahmad, F. B.; Asaruddin, M. R. Polymer based protein therapeutics. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2018**, 19(10), 972–982.
- 12 朱真逸, 宋万通, 陈学思. 高分子免疫佐剂材料. *高分子学报*, **2023**, 54(5), 534–549.
- 13 Guo, S. H.; Fu, D. W.; Utupova, A.; Sun, D. J.; Zhou, M.; Jin, Z.; Zhao, K. Applications of polymer-based nanoparticles in vaccine field. *Nanotechnol. Rev.*, **2019**, 8(1), 143–155.
- 14 Porfiri, M. C.; Melnichuk, N.; Braia, M. J.; Brinatti, C.; Loh, W.; Romanini, D. Analysis of the structure-function relationship of alpha amylase complexed with polyacrylic acid. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2020**, 188, 110787.
- 15 Pichon, S.; Bruyère, I.; Janicot, S.; Silhadi, W.; Pallardy, S.; Minutello, A. M.; Donazzolo, Y.; Latreille, M.; Beloeil, L.; Garcon, N.; Pagnon, A.; Jantet-Blaudez, F.; Piras-Douce, F. Safety and immunogenicity of a cytomegalovirus (CMV) recombinant glycoprotein B (gB) vaccine in combination with polyacrylate or an emulsion-based adjuvants. *Vaccine*, **2026**, 80, 128553.
- 16 Sahin Eguz, I.; Ihlamur, M.; Abamor, E. S.; Topuzogullari, M. Synthesis and immunogenicity of the linear conjugates of polyacrylic acid and antigenic peptide of human papillomavirus. *Eur. Polym. J.*, **2022**, 176, 111425.
- 17 Garinot, M.; Piras-Douce, F.; Probeck, P.; Chambon, V.; Varghese, K.; Liu, Y. Q.; Luna, E.; Drake, D.; Haensler, J. A potent novel vaccine adjuvant based on straight polyacrylate. *Int. J. Pharm. X*, **2020**, 2, 100054.
- 18 Sun, H.; Kabb, C. P.; Sims, M. B.; Sumerlin, B. S. Architecture-transformable polymers: reshaping the future of stimuli-responsive polymers. *Prog. Polym. Sci.*, **2019**, 89, 61–75.
- 19 Zhao, W. C.; Huo, H. Y.; Lu, Z. Y.; Sun, Z. Y. Understanding local conformation in cyclic and linear polymers using molecular dynamics and point cloud neural network. *Chinese J. Polym. Sci.*, **2025**, 43(5), 695–710.
- 20 Shi, Y.; Hou, W. M.; Li, Z. Q.; Chen, Y. M. Tailoring the architecture of molecular bottlebrushes via click grafting-onto strategy. *Macromol. Rapid Commun.*, **2023**, 44(23), 2300362.
- 21 Zhang, Z.; Li, Z. Q.; Shi, Y.; Chen, Y. M. Molecular bottlebrushes as emerging nanocarriers: material design and biomedical application. *Langmuir*, **2024**, 40(14), 7286–7299.
- 22 Saha, D.; Witt, C. L.; Fatima, R.; Uchiyama, T.; Pande, V.; Song, D. P.; Fei, H. F.; Yavitt, B. M.; Watkins, J. J. Opportunities in bottlebrush block copolymers for advanced materials. *ACS Nano*, **2025**, 19(2), 1884–1910.
- 23 Arno, M. C.; Inam, M.; Coe, Z.; Cambridge, G.; MacDougall, L. J.; Keogh, R.; Dove, A. P.; O'Reilly, R. K. Precision epitaxy for aqueous 1D and 2D poly(ϵ -caprolactone) assemblies. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(46), 16980–16985.
- 24 Li, H. A.; Liu, H.; Nie, T. Q.; Chen, Y.; Wang, Z. Y.; Huang, H. H.; Liu, L. X.; Chen, Y. M. Molecular bottlebrush as a unimolecular vehicle with tunable shape for photothermal cancer therapy. *Biomaterials*, **2018**, 178, 620–629.
- 25 Xu, L.; Zhang, Q. Y.; Lu, L. J.; Shi, Y.; Liu, L. X.; Shen, J.; Chen, Y. M. Unimolecular nano-contrast agent with ultrahigh relaxivity and very long retention for magnetic resonance lymphography. *Nano Lett.*, **2022**, 22(10), 4090–4096.
- 26 Liu, C.; Luo, J. H. Protein oligomer engineering: a new frontier for studying protein structure, function, and toxicity. *Angew. Chim. Int. Ed.*, **2023**, 62(23), e202216480.

- 27 Hoarau, M.; Badiéyan, S.; Marsh, E. N. G. Immobilized enzymes: understanding enzyme-surface interactions at the molecular level. *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15(45), 9539–9551.
- 28 Sánchez-Morán, H.; Kaar, J. L.; Schwartz, D. K. Supra-biological performance of immobilized enzymes enabled by chaperone-like specific non-covalent interactions. *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1), 2299.
- 29 Pavot, V.; Bisceglia, H.; Guillaume, F.; Montano, S.; Zhang, L. N.; Boudet, F.; Haensler, J. A novel vaccine adjuvant based on straight polyacrylate potentiates vaccine-induced humoral and cellular immunity in cynomolgus macaques. *Hum. Vaccines Immunother.*, **2021**, 17(7), 2336-2348.

Research Article

Effects of Topological Poly(acrylic acid)s on Protein Conformation and Functions

An-qi Ye¹, Zhe-qi Li¹, Shi-chao You¹, Hao-lin Chen^{1*}, Yi Shi¹, Li-xin Liu¹, Yong-ming Chen^{1,2,3*}

(¹School of Materials Science and Engineering, Key Laboratory of Polymeric Composite Materials and Functional Materials of Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

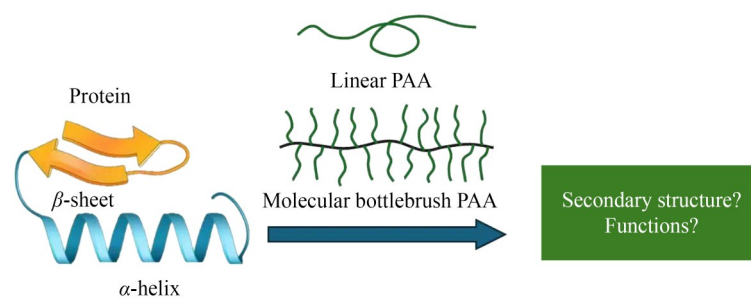
(²College of Chemistry and Molecular Sciences, Henan University, Kaifeng 475004)

(³State Key Laboratory of Antiviral Drugs, Henan University, Zhengzhou 450046)

Abstract Secondary structure of proteins greatly matters the functions, making the study of polymer-protein interactions and their regulatory mechanisms of great significance. Linear poly(acrylic acid) (PAA) affects protein function by interacting with positively charged amino groups on proteins or by altering their secondary structure. However, the impact of other topological PAAs on protein conformation and functions remains unexplored. This study employed a research strategy of comparing molecular weights under the same topological structure and comparing topological structures under similar molecular weights. Through controlled polymerization and click chemistry, a series of linear and brush-type PAAs with different molecular weights were synthesized. Circular dichroism (CD) chromatography was used to investigate the regulatory effects of polymer molecular weight and topological structure on protein conformation and function. First, in the linear PAA system, it was found that low-molecular-weight linear PAAs could significantly convert low-molecular-weight proteins from α -helices to β -sheets in a short time; the higher the PAA molecular weight, the longer the incubation time required for the protein conformational transition to equilibrium. Comparing linear and brush-type PAAs with similar molecular weights, the brush-type PAA significantly accelerated the conformational transition of low-molecular-weight proteins from α -helices to β -sheets. For high-molecular-weight proteins, both topologic PAAs still changed protein conformation greatly, but no clear dependence on polymer molecular weight or topology was observed. Furthermore, we evaluated the functions of two proteins in the presence of topological PAAs. For β -galactosidase, molecular bottlebrush PAA stabilized enzyme activity, while linear PAA rapidly destroyed it. In mouse immunization with ovalbumin (OVA) as a model antigen, linear PAA induced significantly higher OVA-specific IgG titers and splenocyte IFN- γ secretion than molecular bottlebrush PAA. Combining conformation change by CD, we speculated that the drastic remodeling by molecular bottlebrush PAA could damage critical epitopes of OVA, whereas the mild modulation by linear PAA preserved epitope integrity. In conclusion, polymer molecular weight and topology are important parameters for regulating protein structure and function.

* Corresponding authors: Hao-lin Chen, E-mail: chenhl58@mail.sysu.edu.cn

Yong-ming Chen, E-mail: chenym35@mail.sysu.edu.cn



Keywords Polymer topology; Poly(acrylic acid); Molecular bottlebrush; Protein conformation; Adjuvants