



基于构象工程的银基人工水解酶的构建及其催化机制研究*

王 燕** 周彤彤** 郭 圆 王海芳 曹傲能***

(上海大学纳米化学与生物学研究所, 上海 200444)

摘要 **目的** 本研究采用构象工程 (conformational engineering, CE) 技术, 在银纳米颗粒 (AgNP) 上模拟 α 胰凝乳蛋白酶的活性位点, 构建包括催化三联体、氧阴离子孔及底物结合位点的活性中心, 制备高催化活性的人工水解酶, 探索天然酶模拟和高性能人工酶设计的新思路。**方法** 以 AgNP 为骨架, 通过 CE 使设计的多肽的关键催化残基位于 α 螺旋构象一侧, 构建与 α 胰凝乳蛋白酶相似的催化活性中心。通过三氟乙醇诱导构象、Ag-S 键稳定构象和冷冻干燥去除诱导剂三步法实现多肽构象的精准控制。圆二色谱用于证明 α 螺旋构象的形成与稳定; 关键残基的突变结合停流动力学实验用于证明各关键残基的不可或缺, 以及催化三联体、氧阴离子孔及底物结合位点之间的协同作用。**结果** 成功构建了高效的银基人工水解酶——Silverzyme。Silverzyme 对 4-硝基苯基乙酸酯表现出极高的水解活性, 单位活性位点的催化反转数达到 3.5 s^{-1} , 甚至超过了 α 胰凝乳蛋白酶。而且 Silverzyme 还能显著催化水解邻苯二甲酸二乙酯——一种被美国环保署列为环境优先污染物的、难以降解的非活化酯。**结论** 本文通过 CE 技术在 AgNP 表面实现对 α 胰凝乳蛋白酶的复杂催化中心的模拟, 得到具有明确结构和清晰催化机制的高活性人工水解酶, 显示了 CE 技术的广阔应用前景。

关键词 构象工程, 人工酶, 催化三联体, 酶模拟, 银纳米颗粒

中图分类号 O641

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0152

CSTR: 32369.14.pibb.20260152

酶是自然界经过亿万年进化而来的高效生物催化剂^[1-3]。水解酶作为天然酶中结构最复杂、研究最深入且应用最广泛的一类酶^[4], 其精巧的活性中心与协同机制一直是人工水解酶模拟的重点和难点。以酯酶为代表的典型水解酶通常包含底物结合位点、催化三联体以及氧阴离子孔, 三者协同形成一个高效且动态的电荷传递网络, 共同实现对酯键等底物的催化水解^[5-6]。尽管研究者探索了多种策略来模拟催化三联体和氧阴离子孔——从小分子^[7-9]、多肽聚集体^[10-11]、树枝状聚合物^[12]、表面功能化纳米颗粒^[13-15]、分子印迹聚合物^[16-18]到从头设计的酶^[19-22], 但人工水解酶的催化活性仍与天然水解酶相距甚远。即使当前最先进的人工智能计算已能够设计具有精确结构的全新水解酶^[23], 但其催化活性仍然远低于天然水解酶, 反映出模拟和全新设计这一复杂的、高度协同的催化活性中心的难度。因此, 构建能够真正模拟天然酶高效性与特异性的人工水解酶仍然是该领域的重大挑战。

本课题组经过多年探索, 发展出一种构象工程 (conformational engineering, CE) 策略, 成功地在金纳米颗粒上重构了天然蛋白质的部分片段, 得到了一系列具有和天然蛋白质相似功能的人工蛋白质^[24-26]。最近, 本课题组又成功将 CE 策略应用于全新设计的多肽, 在金纳米颗粒表面成功重构了类似于 α 胰凝乳蛋白酶的催化三联体、氧阴离子孔及底物结合位点, 构建了高效的人工水解酶——Goldenzyme^[27]。Goldenzyme 的单活性位点对活化酯键的水解催化效率甚至超越 α 胰凝乳蛋白酶, 并能有效水解较难降解的非活化酯类污染物, 展示了 CE 策略在精确控制纳米颗粒表面功能基团构象的威力。

* 国家自然科学基金 (32371318) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 021-66135277-102, E-mail: ancao@shu.edu.cn

收稿日期: 2026-03-25, 接受日期: 2026-05-21

为了验证CE策略的普适性,排除金纳米颗粒在 Goldenzyme 中可能发挥关键催化作用的疑虑,并克服金基人工水解酶成本较高的问题,本文以成本更低、具有抗菌活性等多种优异性能^[28-29]、且同样适合进行CE的银纳米颗粒(AgNPs)为骨架^[30],旨在利用AgNPs的独特优势,探索构建一种兼具高效催化与抗菌功能的双功能银基人工水解酶(Silverzyme),以进一步验证CE策略在不同载体上的普适性及其功能拓展潜力。

本研究通过系统研究银基人工水解酶的结构与催化机制,进一步证明了CE策略在活性中心构建中的核心作用,明确了关键残基的贡献及其协同效应,验证了CE策略在不同纳米材料体系中的普适性,为天然酶的模拟及人工水解酶的理性设计提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

银纳米颗粒(平均粒径约35 nm)购于上海沪正纳米科技有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、二水合柠檬酸钠和氢氧化钠购于国药集团化学试剂有限公司;4-硝基苯基乙酸酯(p-nitrophenyl

acetate, p-NPA)购于美国Sigma-Aldrich公司;三氟乙醇(2,2,2-trifluoroethanol, TFE)和乙腈购于上海泰坦科技股份有限公司。邻苯二甲酸二乙酯(diethyl phthalate, DEP)购于上海阿达玛斯试剂有限公司。所用试剂均为分析纯。实验中使用超纯水(18.2 MΩ·cm)。

多肽 Triad5 及其关键残基的突变体(Triad5-HSD、Triad5-O、Triad5~W)以及对照肽CL2(表1)均由上海吉尔生物科技有限公司合成,纯度均大于95%。其中,Triad5-HSD为催化三联体残基(D4、H7、S8、S11)全部突变为丙氨酸的突变体,Triad5-O为氧阴离子孔构成残基(R13、G14)缺失的突变体,Triad5~W为底物结合位点(W12)位置移动的突变体。所有多肽均直接用于后续人工水解酶的构建与表征。多肽及其性质包括等电点(pI)、分子质量(molecular mass)和280 nm处吸光系数(ϵ_{280})如表1所示,其中多肽的浓度是通过其在280 nm处的吸光度和估算的吸光系数(<http://web.expasy.org/protparam/>)来确定的。为保持单位纳米颗粒表面上多肽密度与 Goldenzyme 一致^[27],根据AgNP粒径计算,多肽在AgNP上的平均密度控制为大约1 869条/颗粒。

Table 1 Sequences and properties of the designed peptides

Peptide	Peptide sequence	pI	Molecular mass/u	$\epsilon_{280}/(\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1})$
Triad5	NCLDCLHSCGSWRG	6.72	1 550.74	5 625
Triad5-HSD	NCLACLAACGAWRG	7.97	1 408.67	5 625
Triad5-O	NCLDCLHSCGSW	5.08	1 337.51	5 625
Triad5~W	WCLDCLHSCGSNRG	6.72	1 550.74	5 625
CL2	GYCGTNPNYFSCD	3.80	1 440.52	3 104

所用仪器包括:U-3010型紫外-可见光谱仪(日本Hitachi公司);HT7700型透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(日本Hitachi公司);ZS90型纳米粒度分析仪(英国Malvern公司);F-7000型荧光光谱仪(日本Hitachi公司);MOS 500多功能光谱仪及SFM-3000/S停流附件(法国Bio-logic公司);JASCO J-1500圆二色光谱仪(日本Jasco公司);ACQUITY UPLC H-Class高效液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)(配备种电喷雾离子源和离子阱检测器SQ Detector,美国Waters公司);PinAAcle 900T原子吸收光谱仪(美国Perkin Elmer公司);JASCO FT/IR-4100红外光谱仪(日本Jasco公司);TGA2热重分析仪(瑞

士Mettler Toledo公司)。

1.2 AgNP浓度的测定

首先将购买的AgNP溶液在10 000 r/min下离心20 min以去除游离的Ag⁺。然后取一定量的纯化后的AgNP在王水中消解,通过原子吸收光谱仪测定消解液中Ag元素的质量浓度(实验测定值C=(15.0±0.4) g/L)。根据公式(1)计算AgNP的摩尔浓度^[25]。

$$[M] = \frac{C}{N_A \rho \left(\frac{4}{3}\right) \pi r^3}$$

(1)

其中, N_A 是阿伏伽德罗常数, ρ 是AgNP的密度(10.492 kg/L)^[31], r 是AgNP的半径(TEM测定值为17.4 nm), C 是Ag的质量浓度。经过计算,

AgNP的摩尔浓度为0.11 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 基于银纳米颗粒的人工水解酶的制备

首先将10 μl 的0.2 mol/L柠檬酸三钠溶液加到6 ml AgNP溶液中,然后向其中逐滴滴加2 ml 15 mmol/L的多肽溶液(含有50 μl 0.2 mol/L NaOH)。混合液在室温下搅拌1 h。

为精确控制AgNP上多肽的构象,采用两种CE方法。第一种是“先固定后诱导”,即多肽先与AgNP反应生成复合物,再与等体积的TFE在45°C的恒温箱中孵育24 h以诱导AgNP上的多肽产生 α 螺旋构象,然后进行冷冻干燥。第二种是“先诱导后固定”,即先将2 ml多肽溶液与8 ml的TFE混合以诱导多肽产生 α 螺旋构象,然后滴加该多肽溶液到6 ml的AgNP溶液中进行反应,反应结束后再冷冻干燥。冷冻干燥除去TFE即可获得基于AgNP的人工水解酶。

1.4 多肽接枝率的表征

将修饰有多肽的AgNP溶液转移至孔径为30 ku的超滤管中,于2 000 r/min下离心20 min。分别测定离心后所得滤液与初始多肽溶液的荧光强度,根据两者比值计算接枝率。

为进一步验证AgNP表面的多肽接枝率,将接有4 735条/颗粒的AgNP-多肽复合物(多肽质量占比为5%)溶液进行超滤,然后将截留的浓缩AgNP-多肽复合物收集并冷冻干燥,得到约10 mg固体粉末。随后采用热重分析仪对该粉末进行失重测试,升温范围为室温至500°C,升温速率为10°C/min。通过多肽热分解引起的失重质量分数,换算出每个AgNP表面平均偶联的多肽数目。

1.5 红外光谱表征

使用JASCO FT/IR-4100型光谱仪表征多肽形成AgNP-多肽复合物前后的红外光谱变化。具体参数设置如下:将样品多肽Triad5粉末和人工水解酶粉末置于金刚石晶体衰减全反射(attenuated total reflectance, ATR)附件上测定,光谱分辨率为2 cm^{-1} ,采集数据为100次扫描的平均值。

1.6 人工水解酶中多肽结构的表征

用JASCO J-1500圆二色光谱仪测定远紫外圆二色性(circular dichroism, CD)。圆二色光谱仪的参数设置:使用0.1 cm光程的石英比色皿,温度稳定在25°C,波长扫描范围190~250 nm,狭缝宽度5 nm,扫描速度100 nm/min,每0.5 nm采集一个数据点。实验中多肽的浓度为0.1 g/L。每个样品重复测量20遍,累加得到最终的谱图。在测试

AgNP-多肽复合物的样品时,扣除了相应的背景信号,即AgNP-多肽复合物经超滤后的滤液的CD信号,以排除溶液中其他成分对CD信号的干扰。

1.7 人工水解酶活性的检测

为准确扣除人工水解酶溶液中的离子强度等背景信号,对AgNP-多肽复合物溶液进行超滤处理,收集滤液作为构象调控前的缓冲液(buffer before CE)。该缓冲液与构象调控前的AgNP-多肽复合物(AgNP-Pep before CE)所含溶质浓度相同,因此将其用作空白背景。构象调控后的缓冲液(buffer after CE)通过对buffer before CE进行与AgNP-多肽复合物相同的TFE处理获得,其溶质浓度与构象调控后的AgNP-多肽复合物(AgNP-Pep after CE)一致,用作后者的空白背景。对照实验组还包括:未经肽修饰的AgNP在构象调控前后的样品(AgNP before/after CE),以及没有催化位点的CL2对照多肽(源自抗溶菌酶抗体的CDR3区^[32])修饰的AgNP在构象调控前后的样品(AgNP-CL2 before/after CE)。AgNP-CL2 after CE是AgNP-Pep after CE更严格的空白对照,不仅包含了溶液中的影响因素,还包含AgNP以及对照多肽可能的影响。

本文以表征人工水解酶的催化活性常用的p-NPA为底物来表征制备的人工水解酶的活性。水解反应采用停流光谱仪监测。实验中用到的缓冲液有两种,pH从5.8~8.0用的是磷酸盐缓冲液, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$,简称为PB;pH从9.0~10.0用的是碳酸盐缓冲液, $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$,简称为CB。1号注射器装载缓冲液,2号装载人工水解酶溶液,3号装载p-NPA底物。进样体积比为0.5:5.5:4,总体积252 μl ,流速2.5 m/s,反应温度25~65°C。采用分光光度计在400 nm处监测产物对硝基酚(p-NP)的生成,光程0.15 cm,依据p-NP的摩尔吸光系数 $\varepsilon_{400}=10.85 \text{ L}\cdot\text{cm}/\text{mmol}$ 进行定量。

酶的初始催化速率(v_0)由不同底物浓度(0.04~3.6 mmol/L)下反应初始斜率计算,扣除相应空白对照后,将 v_0 代入米氏方程(公式2)拟合得到米氏常数。

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} \times [E] \times [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

其中 k_{cat} 代表催化速率常数, K_m 代表底物结合常数,[E]和[S]分别代表酶和底物的浓度。所报告的结果是至少3次独立测量的平均值。

本文选择DEP作为底物,测试Silverzyme对非

活化酯的水解活性。具体实验操作如下: 将配制的 DEP 溶液、Silverzyme 及磷酸盐缓冲液在 30 ml 玻璃反应瓶中混合, 混合体系中 DEP 浓度为 5 mmol/L, Silverzyme 的浓度为 0.012 $\mu\text{mol/L}$, 磷酸盐缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8.0) 浓度为 160 mmol/L。然后将反应瓶置于恒温混匀仪中, 在 60°C、200 r/min 条件下振荡反应 48 h。反应结束后, 将全部反应液转移至超滤离心管 (Millipore Amicon Ultra-15, 截留分子质量 10 ku), 于 25°C、5 000 r/min 条件下离心 30 min, 实现酶与反应产物的分离。水解产物 (滤液) 用 LC-MS 进行分析, 具体过程如下: 5 μl 滤液被加载到一根反相柱 (ACQUITY UPLC C18: 颗粒尺寸, 1.8 μm ; 孔径, 95 Å; 柱长, 50 mm; 内径, 2.1 mm) 中, 用乙腈/水 (5/95, v/v) 作为流动相洗脱, 流速为 0.4 ml/min, 并在 254 nm 的波长下进行产物监测。

2 结果与讨论

2.1 银基人工水解酶的设计

目前已有大量天然水解酶的三维空间结构得到解析, 我们观察到, 包括 α 胰凝乳蛋白酶在内的多种水解酶的活性中心具有一个典型的结构特征, 即

其催化三联体、氧阴离子孔等关键功能残基在空间呈近似线性排布。基于此, 本课题组前期为在金纳米颗粒表面构建 α 胰凝乳蛋白酶相似的催化活性中心, 设计了一条仅含有 14 个氨基酸的多肽——Triad5 (序列见表 1), 并通过 CE 策略控制 Triad5 在金纳米颗粒表面折叠成动态 α 螺旋构象, 使关键催化残基在 α 螺旋一面分别组成催化三联体、氧阴离子孔及底物结合位点, 得到高催化活性的人工水解酶 Goldenzyme^[27]。然而, 金作为贵金属材料, 其高成本及潜在生物相容性问题在一定程度上限制了该人工水解酶的规模化应用与体内生物医学转化。

银纳米颗粒是一种成本更低材料, 尤为重要, 银纳米颗粒表面同样具有原子流动性——这是进行 CE 的关键基础^[28, 33]。因此, 理论上基于同样策略制备银基人工水解酶 (Silverzyme) 具有可行性。为此, 将 Triad5 通过 Ag-S 键偶联到银纳米颗粒表面, 并通过 CE 在其表面形成类似于 α 胰凝乳蛋白酶相似的催化活性中心, 包含催化三联体 (Asp、His、Ser)、氧阴离子孔 (Gly) 及底物结合位点 (Trp), 制备出 Silverzyme (图 1), 以期以更低成本获得类似 Goldenzyme 的高催化活性。

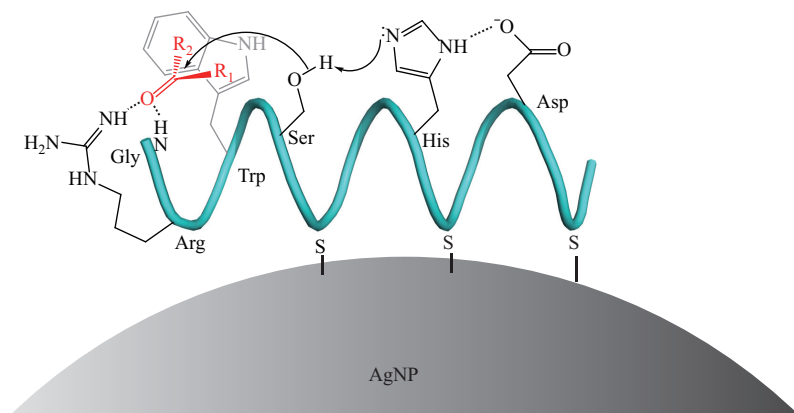


Fig. 1 Schematic active center of Silverzyme with a charge-relay network to catalyze the hydrolysis of substrate

The designed peptide, Triad5, is immobilized on AgNP in a helical conformation, stabilized by three Ag-S bonds. The active center contains a catalytic triad (Asp, His and Ser), an oxyanion hole (formed by the backbone amide of Gly and the sidechain amide of Arg), and a binding site (Trp) for the substrate (shown in red), forming a charge-relay network.

将 Triad5 的关键残基进行一系列的突变 (表 1), 并将这些 Triad5 突变体以同样的方法偶联到 AgNP 上, 经过同样的 CE 处理得到相应的 Silverzyme 突变体。通过比较关键残基对催化活性的影响, 可以确定各个关键残基在 Silverzyme 的催化活性中的作用, 并验证本文的设计思想和 CE 的

效果。

作为对照, 没有催化关键残基的 CL2 多肽以同样的方法偶联到 AgNP 并进行同样的 CE 处理, 将其活性作为更准确的背景扣除, 验证 Silverzyme 的高催化活性完全来自精确控制的催化活性中心。

2.2 AgNP和AgNP-peptide的形貌表征

采用TEM对AgNP及各AgNP-Pep复合物进行表征。如图2a所示,未修饰的AgNP呈球形,粒径分布较为均一,平均直径约为34.8 nm。将Triad5多肽及其3种突变体以及对照肽CL2分别修饰于AgNP表面后,所得到的AgNP-Triad5、AgNP-

Triad5-HSD、AgNP-Triad5-O、AgNP-Triad5~W及AgNP-CL2复合物均保持了良好的单分散状态,未观察到明显的颗粒聚集或形貌改变(图2b~f),为后续CE调控及催化性能研究提供了理想的材料基础。

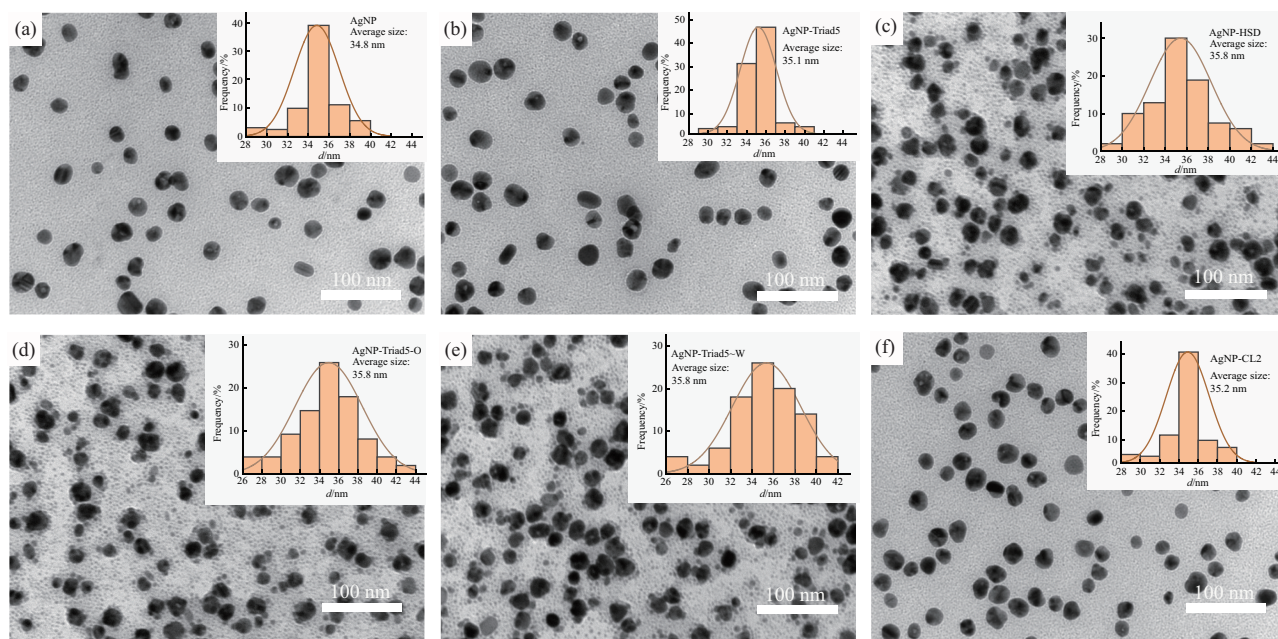


Fig. 2 TEM image and size distribution of different samples

(a) AgNP, (b) AgNP-Triad5, (c) AgNP-Triad5-HSD, (d) AgNP-Triad5-O, (e) AgNP-Triad5~W, (f) AgNP-CL2.

接着,用动态光散射法表征了AgNP在连接多肽前后的水合粒径的改变(图3a)。与TEM分析结果类似,AgNP-Pep复合物的水合粒径与未经修饰的AgNP相比数值有轻微增加,说明多肽已连接到

了AgNP上。红外光谱显示(图3b),AgNP-Triad5复合物在 3289 cm^{-1} 处酰胺A区的谱带与Triad5相比出现明显变宽,进一步证实多肽已经连接到了AgNP表面^[34]。

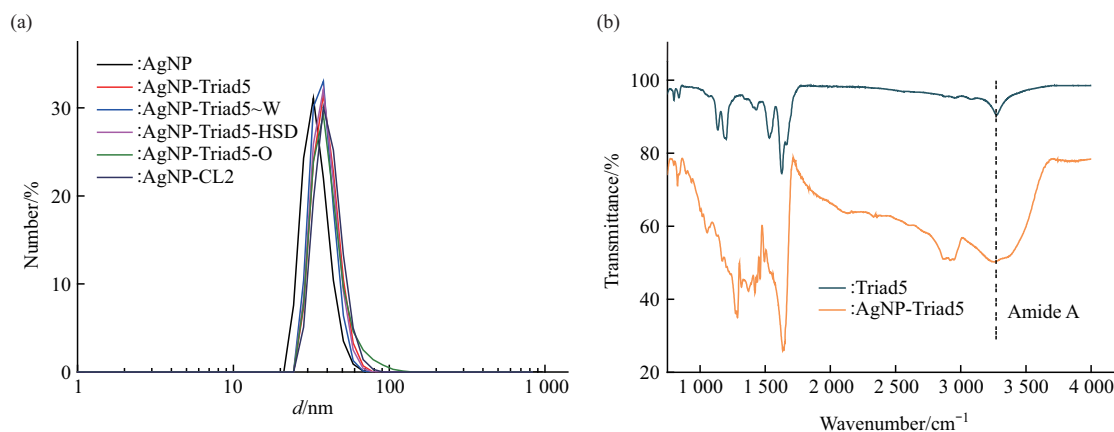


Fig. 3 Characterization of covalent conjugation between AgNP and peptides

(a) Hydrodynamic diameter distributions measured by DLS. (b) FT-IR spectra showing the amide A band broadening.

2.3 多肽偶联AgNP的效率表征

为确定偶联效率, 采用荧光光谱法对AgNP-Pep复合物溶液超滤分离后的下清液(含未与AgNP偶联的多肽)进行分析。如图4所示, 橙色曲线对应反应体系中初始投入的多肽总量, 而黄色曲线则为反应混合体系经超滤后收集的滤液。对比二者在350 nm处的荧光发射强度可见, 黄色曲线的信号几乎可忽略不计, 表明滤液中的多肽含量极低。据此可推断, 在本实验所采用的浓度范围内,

多肽已近乎完全偶联到AgNP表面。

为进一步验证多肽在AgNP表面的高效偶联, 对多肽偶联密度更高的AgNP-Pep复合物进行了热重分析。结果显示, 多肽修饰后的AgNP在升温过程中呈现约5.2%的质量损失, 与多肽的理论质量占比(5%)基本相符, 验证了多肽与AgNP的高效偶联。而之所以总失重略大于多肽的理论质量占比, 除了实验误差之外, 主要是AgNP表面残留的柠檬酸根的贡献。

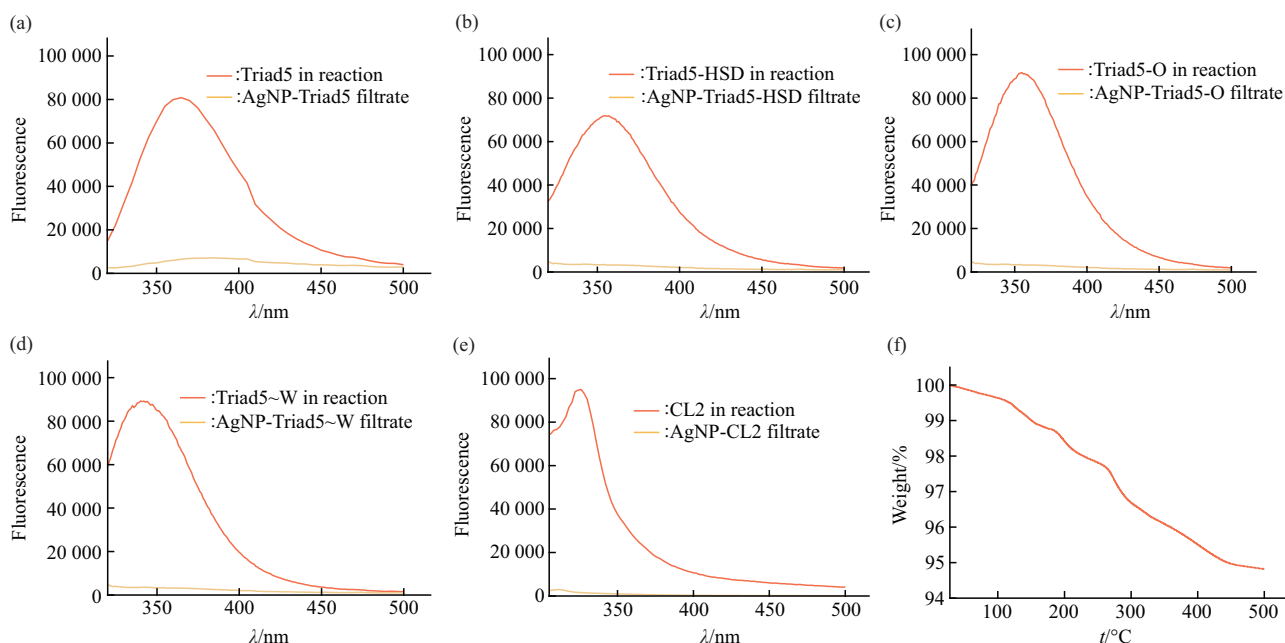


Fig. 4 Characterization of the grafting efficiency of Silverzyme

(a-e) Fluorescence spectra of AgNP-Triad5 (a), AgNP-Triad5-HSD (b), AgNP-Triad5-O (c), AgNP-Triad5-W (d), AgNP-CL2 (e) before conjugation onto AgNP (orange lines) and the free peptides after conjugation (yellow lines); (f) TGA curve of AgNP-Triad5 conjugate.

2.4 银基人工水解酶的构象调控

完成多肽在AgNP表面的共价连接后, 沿用与金纳米颗粒体系相同的CE策略, 对AgNP表面多肽的构象进行调控。如图5a所示, 经CE处理的Triad5多肽在AgNP表面呈现出的 α 螺旋构象, 其CD特征与在50% TFE溶液中形成的典型 α 螺旋结构高度吻合, 表现为在208 nm和222 nm处的双负峰。相比之下, 游离态的Triad5多肽以及未经CE处理的AgNP-Triad5复合物均未表现出明显的 α 螺旋特征, 主要以无规卷曲构象存在。

进一步研究发现, 无论是“先诱导后固定”(TFE-induction before conjugation)还是“先固定后诱导”(TFE-induction after conjugation)的CE处理方式, 均能在AgNP表面实现对Triad5螺旋结构

的有效构建(图5b)。而作为对照, AgNP-CL2复合物的CD无论在CE处理前后均呈无规构象特征(图5c); 虽然AgNP-CL2复合物在50% TFE溶液存在时可被诱导出 α 螺旋构象, 但去除诱导剂后其CD又恢复无规构象特征。

根据限域下最低能量片段(confined lowest energy fragment, CLEF)假说^[35-36], 天然蛋白质可以看成是由多个CLEF拼合而成。这些CLEF在原蛋白质中的天然构象是CLEF自身的热力学能量极小构象, 但不一定是其能量最低构象, 而是在少数强长程相互作用约束下的最稳定构象。因此, 如果能通过纳米颗粒与CLEF之间的相互作用来模拟CLEF在原蛋白质中的强长程相互作用约束, 就可以在纳米颗粒上重构了CLEF的天然构象^[24-26]。同

样, Triad5之所以能够在金和银纳米颗粒表面以 α 螺旋构象稳定存在, 首先是因为Triad5本身具有一定的形成 α 螺旋构象的倾向性(能量极小构象)。但就像天然蛋白质中 α 螺旋片段在独立存在时往往也呈现近似无规的构象一样, 虽然Triad5具有一定的形成 α 螺旋构象的倾向性, 但自由的Triad5在溶液中主要呈现近似无规的构象。天然蛋白质中 α 螺旋片段之所以形成稳定的 α 螺旋构象, 是因为蛋白质中的长程相互作用提供的约束稳定作用, 而在Goldenzyme和Silverzyme中, Au-S键和Ag-S键则分别为Triad5提供了类似的长程约束稳定作用。

而CL2多肽是源自一个抗溶菌酶抗体的CDR3

区^[32, 37], 其天然构象是loop结构, 其CD近似无规构象特征。尽管50% TFE可以诱导AgNP-CL2呈现 α 螺旋构象, 但除去TFE后, 由于Ag-S键的可移动性, 根据CLEF假说^[35-36], AgNP-CL2将自动恢复其天然构象——loop结构, 所以其CD又呈现近似无规构象特征。

值得注意的是, “先诱导后固定”与“先固定后诱导”两种构象诱导的方式所得AgNP-Triad5样品的CD特征基本一致。这一结果不仅验证了Triad5多肽序列设计的合理性, 更表明CE可作为一种通用手段, 在不同纳米材料表面实现对多肽二级结构的精准调控。

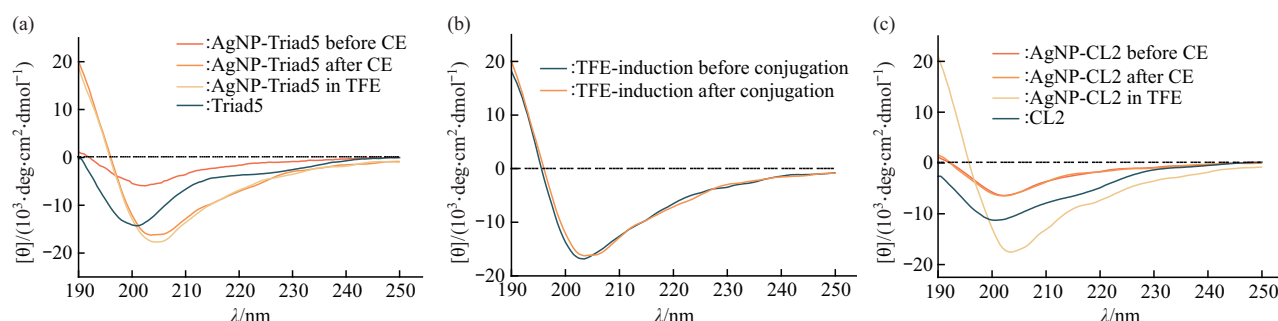


Fig. 5 Conformational characterization of Silverzyme

(a) CD spectra of free Triad5 peptide, the AgNP-Triad5 before CE, the AgNP-Triad5 in 50% TFE, and the AgNP-Triad5 after CE (TFE was removed by lyophilization). (b) CD spectra of AgNP-Triad5 with TFE induction before and after Triad5 conjugation. (c) CD spectra of free CL2 peptide, the AgNP-CL2 before CE, the AgNP-CL2 in 50% TFE, and the AgNP-CL2 after CE (TFE was removed by lyophilization).

2.5 银基人工水解酶的催化性能及其催化机制分析

为定量测量人工水解酶(AgNP-Triad5 after CE)的催化活性, 在相同条件下对一系列对照样品的p-NPA水解速率进行了测定(图6)。结果显示, p-NPA在未经任何处理的缓冲液(buffer before CE)中表现出一定的水解速率, 这主要是样品中盐离子的贡献。而p-NPA在经TFE诱导及冻干处理后获得的buffer after CE中的水解速率进一步提高, 表明残余的TFE对催化有一定的影响。因此在对经CE处理后的样品进行评估时必须以相应的缓冲溶液背景作为空白背景进行扣除。未修饰的AgNP在CE处理前后均表现出一定的催化活性, 且高于相应缓冲液背景, 说明AgNP表面本身对p-NPA水解存在促进作用。AgNP-CL2在CE处理前后的催化速率与未修饰的AgNP基本一致, 证实缺乏关键残基的对照肽无法通过CE获得催化能力, 其微弱活性完全来源于AgNP的贡献。

最关键的是, 经CE处理后的AgNP-Triad5 after CE展现出 $21.6 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ 的高催化速率。扣除buffer after CE背景后, 净速率仍高达 $18.2 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ 。这一数值约是AgNP-Triad5 before CE的净速率的3倍, 更是AgNP after CE和AgNP-CL2 after CE的净速率的10倍以上。显著的催化活性提升结合CD结果明确无误地证实, CE策略成功地将AgNP表面的Triad5多肽从低活性的无序构象重构为高活性的 α 螺旋构象。所有对照样品的低活性排除了纳米颗粒本身催化或者盐离子催化的可能性, 确证了所观测到的高催化活性源于CE所构建的特定催化活性中心。

为确保后续动力学参数测定的准确性, 在开展米氏方程拟合及催化速率比较时, 均采用扣除相应buffer背景活性后的净催化速率进行分析, 以更真实地反映人工水解酶自身的催化特性。

图6c~i和表2展示了Silverzyme的米氏方程拟合结果及动力学参数。因突变体催化活性大大下

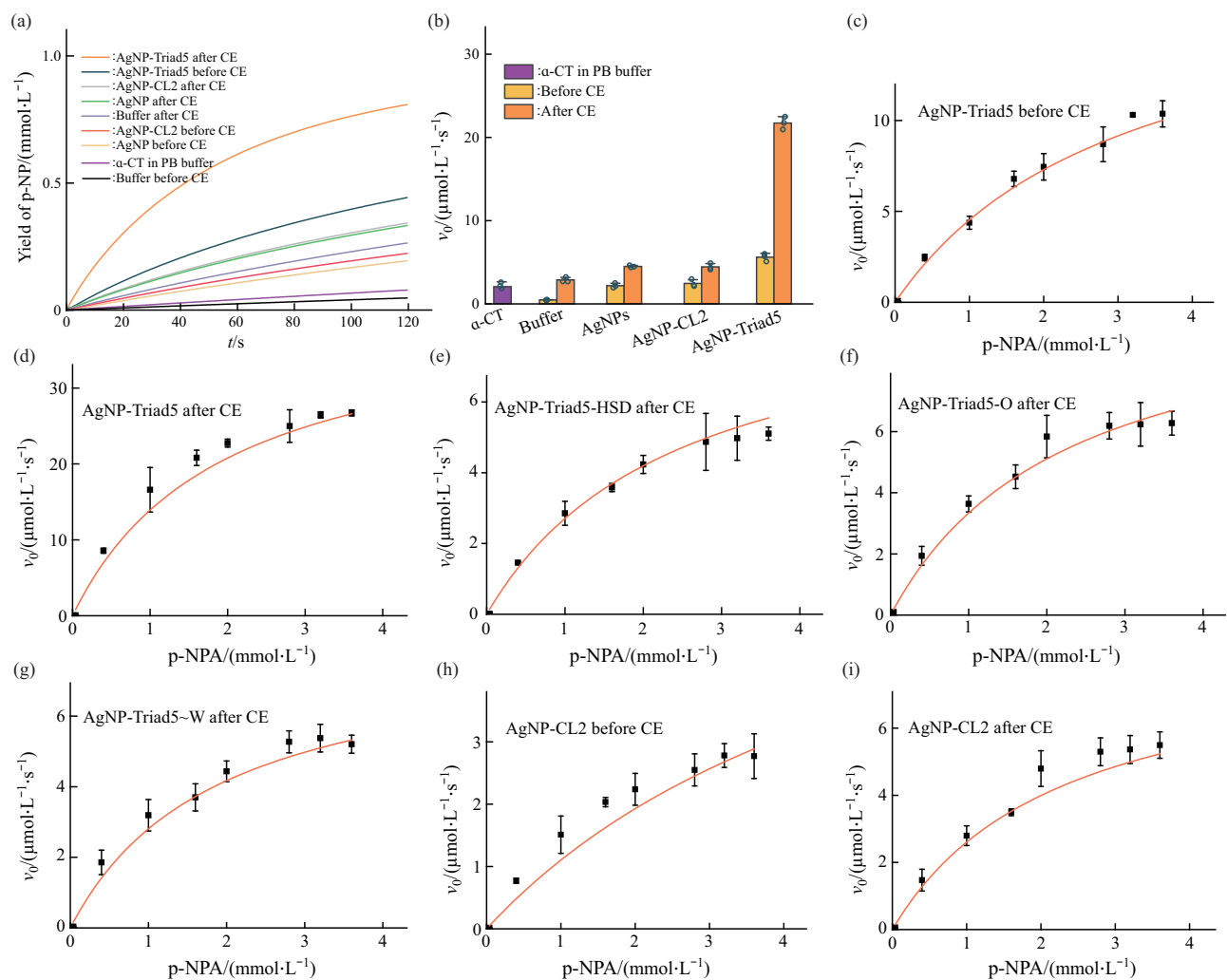


Fig. 6 Catalytic hydrolysis of p-NPA by Silverzyme and its mutants

(a) Hydrolysis process of Silverzyme (AgNP-Triad5 after CE), the controls and background. (b) Catalytic activity of Silverzyme (AgNP-Triad5 after CE), the controls and background. (c) Michaelis-Menten kinetics of AgNP-Triad5 before CE. (d) Michaelis-Menten kinetics of AgNP-Triad5 after CE. (e) Michaelis-Menten kinetics of AgNP-Triad5-HSD after CE. (f) Michaelis-Menten kinetics of AgNP-Triad5-O after CE. (g) Michaelis-Menten kinetics of AgNP-Triad5~W after CE. (h) Michaelis-Menten kinetics of AgNP-CL2 before CE. (i) Michaelis-Menten kinetics of AgNP-CL2 after CE. Conditions for the hydrolysis: [AgNP]=0.005 μmol/L, [Peptide]=10 μmol/L, [α-CT]=10 μmol/L, [acetonitrile]=2% (v/v), [phosphate buffer]=40 mmol/L, pH=7.0, t=25°C. Data of α-CT come from [27]. Error bars indicate the SDs of triplicate experiments.

降, 其催化速率减去相应的AgNP-CL2后不能用米氏方程拟合, 所以先用仅减去相应buffer背景的催化速率拟合出Silverzyme及其突变体的 k_{cat} 值后, 再将各样品的 k_{cat} 值扣除对应条件下AgNP-CL2 before/after CE的背景贡献, 所得数值记为 k'_{cat} , 并计算 $k'_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 以评估催化效率。因突变体和AgNP-CL2催化活性较低, 米氏方程拟合误差变大, 导致部分 k'_{cat} 呈现负值。以AgNP-CL2 before/after CE作为背景扣除是对Silverzyme催化活性更保守的估算。经这一严格的背景扣除后, Silverzyme的整体 k'_{cat} 为 $(6.6\pm3.1)\times10^3\text{ s}^{-1}$ 。由于每个Silverzyme颗粒平均

负载1 869个多肽或活性位点, 因此单位活性位点的 k'_{cat} 为 3.5 s^{-1} 。作为对比, 本课题组前期报道的金基人工水解酶(Goldenzyme, 其中金纳米颗粒大小约为3.6 nm, 每个粒子含20个活性位点)对p-NPA水解催化的单位活性位点 k'_{cat} 为 6.4 s^{-1} , 而天然α胰凝乳蛋白酶 k_{cat} 为 1.2 s^{-1} (表2)^[27]。Silverzyme和Goldenzyme对p-NPA的单位活性位点催化活性均显著高于天然α胰凝乳蛋白酶, 进一步证实了CE策略在构建高效人工水解酶方面的优越性。

特别需要指出的是, AgNP-Triad5在CE处理前后的动力学参数发生了显著变化。由表2结果可

知, 经CE处理后, AgNP-Triad5 after CE的 k_{cat} 值较处理前(AgNP-Triad5 before CE)提升了3倍, 总催化效率(k'_{cat}/K_m)提升近5倍, 显示了构象工程处理的巨大作用。

为了进一步证明催化三联体的不可或缺的作用, 合成了将Triad5中催化三联体残基全部突变为丙氨酸的多肽——Triad5-HSD。动力学分析表明, AgNP-Triad5-HSD after CE的 k'_{cat} 值较AgNP-Triad5 after CE下降约98.5%, 总催化效率 k'_{cat}/K_m 下降约98.9%, 证实该催化三联体是Silverzyme获得高效催化活性的核心前提。

为验证所设计的氧阴离子孔的关键作用, 将Triad5中负责构成氧阴离子孔的C端甘氨酸及其邻近残基进行删除, 获得突变体Triad5-O。实验结果显示, AgNP-Triad5-O after CE的 k'_{cat} 值较AgNP-Triad5 after CE下降约94.1%, k'_{cat}/K_m 下降约95.0%, 表明氧阴离子孔对稳定过渡态、降低反应能垒具有不可替代的贡献。

最后, 利用Triad5~W突变体研究了底物结合位点与催化中心之间的协同关系。在该突变体中,

底物结合位点色氨酸(W12)并未被删除, 但其位置与N端天冬酰胺(N1)发生互换, 而催化三联体及氧阴离子孔的关键残基均保持不变。值得注意的是, 这种仅改变结合位点空间位置的突变导致催化活性急剧下降, 其 k_{cat} 值甚至低于无功能对照肽AgNP-CL2 after CE的水平(经背景扣除后呈现负值)。尽管该突变体对底物的表观亲和力有所提高($K_m=1.8 \text{ mmol/L}$), 但其整体催化效率仍远低于AgNP-Triad5 after CE。这一结果强有力地证明, 催化残基与底物结合位点之间精确的空间协同关系是实现高效催化的必要条件——结合位点不仅负责底物识别, 更需将底物精确锚定于催化三联体的攻击范围内, 二者空间位置的微妙改变即可导致催化功能的大幅丧失。

上述结果揭示了催化三联体、氧阴离子孔及底物结合位点之间的协同作用——三者不仅在空间上精密排布, 更在功能上相互依赖, 共同构成一个协同高效的催化网络(图1)。任一关键氨基酸的缺失或空间位置的改变, 都将导致整体催化效率的大幅下降。

Table 2 Kinetic parameters for catalyzing the hydrolysis of p-NPA

Catalyst	$k_{\text{cat}}/$ ($10^3 \cdot \text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{cat}}^*/$ ($10^3 \cdot \text{s}^{-1}$)	$K_m/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$(k_{\text{cat}}/K_m)/$ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$(k'_{\text{cat}}/K_m)/$ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
AgNP-Triad5 before CE	3.7±1.2	2.2±1.6	3.1±1.8	1.2×10^6	7.1×10^5
AgNP-Triad5 after CE (Silverzyme)	8.3±3.0	6.6±3.1	1.9±1.2	4.4×10^6	3.5×10^6
AgNP-Triad5-HSD after CE	1.8±0.9	0.1±1.1	2.8±1.7	6.4×10^5	3.6×10^4
AgNP-Triad5-O after CE	2.1±0.2	0.4±0.6	2.2±0.6	9.5×10^5	1.8×10^5
AgNP-Triad5~W after CE	1.6±0.4	-0.1±0.7	1.8±1.0	8.9×10^5	—
AgNP-CL2 before CE	1.5±1.0	—	5.9±4.3	2.5×10^5	—
AgNP-CL2 after CE	1.7±0.5	—	2.3±1.1	7.4×10^5	—
Goldenzyme (AuNP-Triad5 after CE) ^[27]	0.147±0.014	0.127±0.014	2.0±0.5	7.4×10^4	6.7×10^4
α -CT ^[27]	0.001 2±0.000 7	—	1.3±0.8	9.2×10^2	—

*Silverzyme及其突变体的 k'_{cat} 为背景扣除后的催化常数, 即实测 k_{cat} 值减去对应条件下AgNP-CL2 before/after CE的 k_{cat} 值所得。Goldenzyme及 α -CT数据引自文献[27]。

2.6 银基人工水解酶最适温度与pH研究

本文对Silverzyme在25~65℃及pH 5.8~10.0范围内的催化活性进行了测定。实验结果(图7a, b)表明, 与 α 胰凝乳蛋白酶(37℃)相比, Silverzyme的最适催化温度(45℃)更高, 而且其65℃时的催化活性仍高于其37℃时的催化活性, 显示其更好的热稳定性。同时, Silverzyme在不同pH条件下的催化活性表现出典型的钟形活性曲线(图7c, d), 在pH 8.0的条件下呈现最高催化活性。这一pH变化趋势与 α 胰凝乳蛋白酶等典型催

化三联体水解酶相似, 其中在pH7左右的活性升高与活性中心组氨酸侧链的质子化状态密切相关^[27]。

2.7 银基人工水解酶的热稳定性研究

为进一步评估Silverzyme的热稳定性, 将样品置于100℃加热处理1 h后, 自然冷却至室温, 分别测试其二级结构与催化活性。CD分析表明, 热处理并冷却后的Silverzyme, 其CD特征与未处理样品基本一致(图8a), 说明多肽的二级结构在高温处理后能够有效恢复。催化活性测定结果显示,

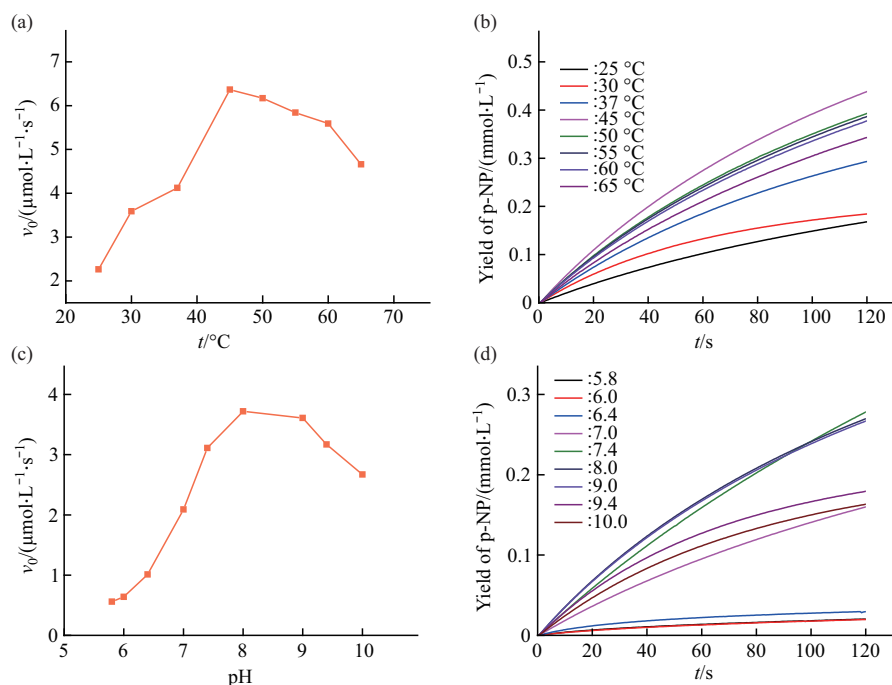


Fig. 7 Optimal temperature and pH for Silverzyme

(a) Initial reaction rate (v_0) of Silverzyme from 25°C to 65°C. (b) Hydrolysis process of Silverzyme from 25°C to 65°C. (c) Initial reaction rate (v_0) of Silverzyme from pH 5.8 to pH 10.0. (d) Hydrolysis process of Silverzyme from pH 5.8 to pH 10.0. Conditions for the hydrolysis: [Silverzyme]=0.001 $\mu\text{mol/L}$, [S]=1 mmol/L, [acetonitrile]=2% (v/v), [PB]=40 mmol/L.

热处理并冷却后的 Silverzyme 对 p-NPA 的水解活性与未处理样品相比未见显著下降 (图 8b, c)。以上结果表明, Silverzyme 具有优异的热稳定性, 即其在经历极端高温处理后, 仍能恢复原有的构象与

催化功能。作为对比, α 胰凝乳蛋白酶经过相同的热处理后, 其天然构象和催化活性都无法完全恢复^[27]。这一结果表明, Silverzyme 具备优于天然酶的热稳定性。

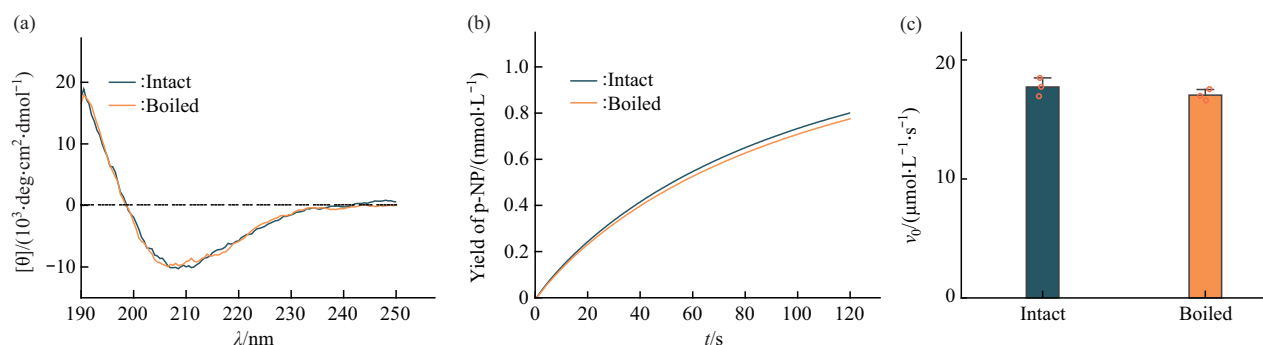


Fig. 8 Thermal stability of Silverzyme

(a) Far-UV CD spectra. (b) Hydrolysis processes of p-NPA. (c) Catalytic activity of Silverzyme before and after being boiled, the buffer background subtracted. Blue lines: intact enzyme. Orange lines: enzymes were boiled for 1 h followed by natural cooling to 25°C. Conditions for the hydrolysis: [Silverzyme]=0.005 $\mu\text{mol/L}$, [S]=1 mmol/L, [acetonitrile]=2% (v/v), [PB]=40 mmol/L, pH=7.0, $t=25^\circ\text{C}$. Error bars indicate the SDs of triplicate experiments.

2.8 银基人工水解酶对非活化酯DEP的水解

p-NPA 是一种活化酯, 其稳定性差、非催化水

解本底高。由于目前绝大多数人工酶的催化活性较差, 对稳定的非活化酯不具备催化活性, 所以

p-NPA 是常用的测试人工水解酶活性的底物。但 p-NPA 存在较显著的自水解, 而且其水解受多种条件影响, 因此很多基于 p-NPA 的人工水解酶的催化活性数据重复性差, 甚至只是未很好控制水解条件的实验假象, 其典型表现就是虽然 $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ 很高, 但 k_{cat} 本身很小, 这一现象被称为“对硝基苯酯综合征”^[38]。

上面已证明 Silverzyme 对活化酯的水解具有很高的 k_{cat} 。为了进一步测试 Silverzyme 的催化活性, 选用典型的非活化酯——DEP 作为底物进行测试。DEP 是一种难以自然降解的增塑剂, 具有内分泌干扰与致癌风险, 已被美国环境保护署 (US Environmental Protection Agency, USEPA) 列为环境优先污染物。LC-MS 表征结果显示 (图 9), Silverzyme 对 DEP 表现出显著的水解活性, 48 h 后产物邻苯二甲酸单乙酯 (monoethyl phthalate, MEP) 生成率约为 22%, 大致对应于 Silverzyme 的

每个活性位点每小时反转一次 ($k_{\text{cat}} \sim 1 \text{ h}^{-1}$)。这一催化活性对人工水解酶来说是一个非常显著的结果。作为对照, α 胰凝乳蛋白酶在同样条件下水解 DEP 生成 MEP 的产率仅为 10% 左右^[27]。当然 α 胰凝乳蛋白酶的天然底物是蛋白质和多肽, 虽然它对酯键的催化活性比绝大多数人工酶都高, 但它对酯键的水解没有专一性。Silverzyme 对非活化酯 DEP 的显著的催化活性进一步验证了成功在 AgNP 上构建了高效的催化活性中心, 凸显了 CE 策略在构建复杂催化中心方面的优势和潜力。

需要指出的是, Silverzyme 对 DEP 的催化目前仍需较苛刻的反应条件, 距离环境条件下的直接应用尚有差距, 后续研究将致力于提升其在温和条件下的催化效率。同时, 还需要考虑在复杂环境中纳米颗粒可能的聚集问题, 以及银纳米颗粒固有的银离子缓慢释放特性带来了潜在的生物安全风险^[39]。

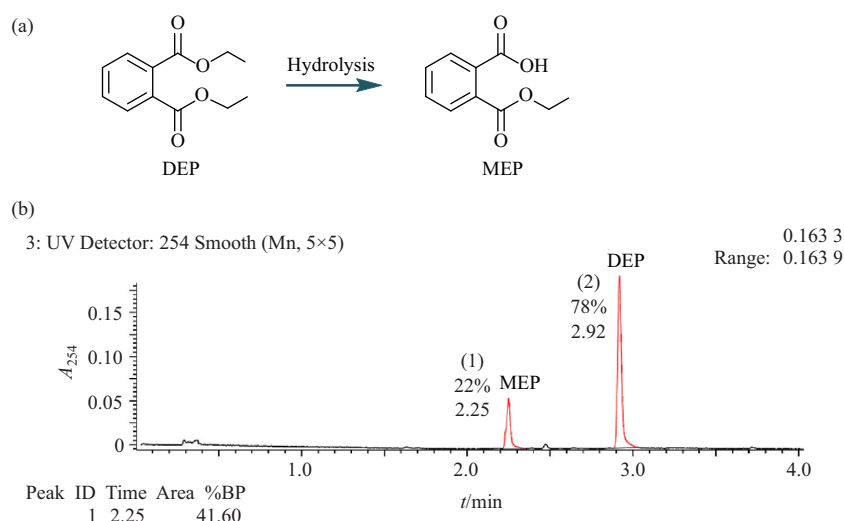


Fig. 9 Degradation of DEP by Silverzyme

(a) Degradation equation of DEP. (b) LC-MS analysis of the hydrolysis products of DEP catalyzed by Silverzyme for 48 h. Conditions for the hydrolysis: [Silverzyme]=0.012 $\mu\text{mol/L}$, [DEP]=5 mmol/L, [acetonitrile]=10% (v/v), [PB]=160 mmol/L PB, pH=8.0, $t=60^\circ\text{C}$.

3 结 论

本文基于 CE 技术, 利用一条仅含 14 个氨基酸的设计多肽, 成功在 AgNP 表面构建了由催化三联体、氧阴离子孔及底物结合位点组成的酶催化活性中心, 制备得到具有高催化活性的银基人工水解酶 Silverzyme, 实现了对 α 胰凝乳蛋白酶催化活性中心的精确模拟。动力学分析表明, Silverzyme 对模

型底物 p-NPA 的水解表现出极高的催化活性, 其单位活性位点的催化反转数达到 3.5 s^{-1} , 高于天然 α 胰凝乳蛋白酶的水平。而且 Silverzyme 还能显著水解难以降解的环境优先污染物 DEP。定点突变实验进一步证实, 所设计的催化三联体、氧阴离子孔及底物结合位点之间的协同作用是实现高效催化的关键。此外, Silverzyme 展现出与金基人工水解酶相当的热稳定性, 经高温处理并冷却至室温后, 其结构与功能均能有效恢复。本研究不仅成功将 CE

策略拓展至银纳米材料体系, 更通过构建结构明确、机制清晰的高活性人工水解酶, 充分展现了CE技术在模拟天然酶的复杂催化中心方面的广阔应用前景。

数据可用性声明 本篇论文的关联数据 (DOI: 10.57760/sciencedb. 37697; CSTR: 31253.11. sciencedb. 37697) 可在科学数据银行 (Science Data Bank, ScienceDB) 数据库 (<https://www.scidb.cn/S/QNneUj>) 中依申请访问获取。

参 考 文 献

- [1] Benkovic S J, Hammes-Schiffer S. A perspective on enzyme catalysis. *Science*, 2003, **301**(5637): 1196-1202
- [2] Kumar A, Verma V, Dubey V K, *et al.* Industrial applications of fungal lipases: a review. *Front Microbiol*, 2023, **14**: 1142536
- [3] Chatonnet A, Perochon M, Velluet E, *et al.* The ESTHER database on alpha/beta hydrolase fold proteins - an overview of recent developments. *Chem Biol Interact*, 2023, **383**: 110671
- [4] Whitcomb D C, Lowe M E. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci*, 2007, **52**(1): 1-17
- [5] Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *ChemInform*, 2003, **34**(6): 200306269
- [6] Nothling M, Xiao Z, Bhaskaran A, *et al.* Synthetic catalysts inspired by hydrolytic enzymes. *ACS Catal*, 2019, **9**(1): 168-187
- [7] Garrido-González J J, Sánchez-Santos E, Habib A, *et al.* Transesterification of non-activated esters promoted by small molecules mimicking the active site of hydrolases. *Angew Chem Int Ed*, 2022, **61**(35): e202206072
- [8] Chen T, Xu Z. Hydrophobic interaction-assisted immobilization of molecular catalysts into organic colloids: from organic synthesis in water to mimicking enzymes. *Coord Chem Rev*, 2026, **547**: 217129
- [9] Kumar A, Nothling M D, Aitken H M, *et al.* Simple synthetic route to an enzyme-inspired transesterification catalyst. *Catal Sci Technol*, 2022, **12**(22): 6655-6659
- [10] Zhang C, Xue X, Luo Q, *et al.* Self-assembled peptide nanofibers designed as biological enzymes for catalyzing ester hydrolysis. *ACS Nano*, 2014, **8**(11): 11715-11723
- [11] Li Y, Jiang L, Liu Y, *et al.* Design strategy of PepNzymes-SH for an emerging catalyst with serine hydrolase-like functionality. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2025, **17**(6): 8821-8835
- [12] Esposito A, Delort E, Lagnoux D, *et al.* Catalytic peptide dendrimers. *Angew Chem Int Ed*, 2003, **42**(12): 1381-1383
- [13] Mikolajczak D J, Berger A A, Koksche B. Catalytically active peptide - gold nanoparticle conjugates: prospecting for artificial enzymes. *Angew Chem Int Ed*, 2020, **59**(23): 8776-8785
- [14] Taguchi T, Isozaki K, Miki K. Enhanced catalytic activity of self-assembled-monolayer-capped gold nanoparticles. *Adv Mater*, 2012, **24**(48): 6462-6467
- [15] Pengo P, Polizzi S, Pasquato L, *et al.* Carboxylate-imidazole cooperativity in dipeptide-functionalized gold nanoparticles with esterase-like activity. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(6): 1616-1617
- [16] Bose I, Zhao Y. Selective hydrolysis of aryl esters under acidic and neutral conditions by a synthetic aspartic protease mimic. *ACS Catal*, 2021, **11**(7): 3938-3942
- [17] Liu S, Du P, Sun H, *et al.* Bioinspired supramolecular catalysts from designed self-assembly of DNA or peptides. *ACS Catal*, 2020, **10**(24): 14937-14958
- [18] Liu Y, Cheng Y, Hao Y, *et al.* Molecularly imprinted nanoreactors: bridging enzyme mimicry and synthetic catalysis. *Nano Today*, 2026, **68**: 103002
- [19] Burton A J, Thomson A R, Dawson W M, *et al.* Installing hydrolytic activity into a completely *de novo* protein framework. *Nat Chem*, 2016, **8**(9): 837-844
- [20] Makhlynets O V, Korendovych I V. Functional frankensteins. *Nat Chem*, 2016, **8**(9): 823-824
- [21] Mak W S, Siegel J B. Computational enzyme design: transitioning from catalytic proteins to enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, **27**: 87-94
- [22] Wang Y, Yang L, Wang M, *et al.* Bioinspired phosphatase-like mimic built from the self-assembly of *de novo* designed helical short peptides. *ACS Catal*, 2021, **11**(9): 5839-5849
- [23] Lauko A, Pellock S J, Sumida K H, *et al.* Computational design of serine hydrolases. *Science*, 2025, **388**(6744): eadu2454
- [24] Yan G H, Wang K, Shao Z, *et al.* Artificial antibody created by conformational reconstruction of the complementary-determining region on gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(1): E34-E43
- [25] 许艳娇, 李文浩, 高天歌, 等. 金抗体替代ELISA中的天然抗体用于溶菌酶检测. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(1): 242-249
- [25] Xu Y J, Li W H, Gao T G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(1): 242-249
- [26] 盛玲洁, 徐佳, 戴静静, 等. 抗体片段在铂纳米粒子表面的构象重构. *生物化学与生物物理进展*, 2024, **51**(3): 647-657
- [26] Sheng L J, Xu J, Dai J J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2024, **51**(3): 647-657
- [27] Wang Y, Cao Y, Liu Y Y, *et al.* A highly efficient artificial hydrolase with a well-defined dynamic active center. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2026. DOI:10.1021/acsami.6c03903
- [28] Arvizo R R, Bhattacharyya S, Kudgus R A, *et al.* Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chem Soc Rev*, 2012, **41**(7): 2943-2970
- [29] Wang Y W, Tang H, Wu D, *et al.* Enhanced bactericidal toxicity of silver nanoparticles by the antibiotic gentamicin. *Environ Sci Nano*, 2016, **3**(4): 788-798
- [30] Xu J, Gao T, Sheng L, *et al.* Conformationally engineering flexible peptides on silver nanoparticles. *iScience*, 2022, **25**(6): 104324
- [31] Smith D R, Fickett F R. Low-temperature properties of silver. *J Res Natl Inst Stand Technol*, 1995, **100**(2): 119
- [32] Wang Y, Wang X, Gao T, *et al.* Folding of flexible protein

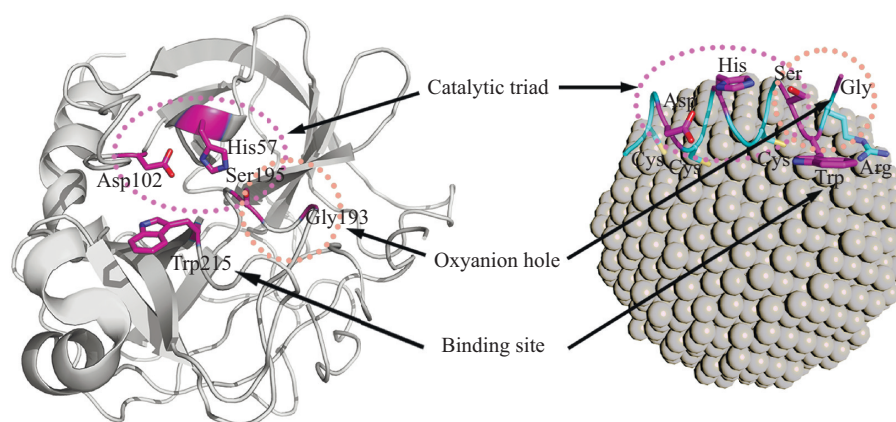
- fragments and design of nanoparticle-based artificial antibody targeting lysozyme. *J Phys Chem B*, 2022, **126**(27): 5045-5054
- [33] Zhao W, Sun Y, Che L, *et al.* Conformational engineering of flexible protein fragments on the surface of different nanoparticles: the surface-atom mobility rules. *ChemMedChem*, 2025, **20**(8): e202400832
- [34] Mikolajczak D J, Heier J L, Schade B, *et al.* Catalytic activity of peptide – nanoparticle conjugates regulated by a conformational change. *Biomacromolecules*, 2017, **18**(11): 3557-3562
- [35] 曹傲能. 蛋白质结构的“限域下最低能量结构片段”假说与蛋白质进化的“石器时代”. *物理化学学报*, 2020, **36**(1): 231-240
Cao A N. *Acta Phys Chim Sin*, 2020, **36**(1): 231-240
- [36] Cao A. The last secret of protein folding: the real relationship between long-range interactions and local structures. *Protein J*, 2020, **39**(5): 422-433
- [37] Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, *et al.* Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*, 1997, **414**(3): 521-526
- [38] Menger F M, Ladika M. Origin of rate accelerations in an enzyme model: the p-nitrophenyl ester syndrome. *J Am Chem Soc*, 1987, **109**(10): 3145-3146
- [39] Bu X, Qiao S, Yang D, *et al.* Global climate change reshapes nanoparticles' fate: rethinking risks and opportunities for soil-plant health. *Environ Res*, 2026, **301**: 124497

Construction of Silver Nanoparticle–based Artificial Hydrolases *via* Conformational Engineering and Study of Its Catalytic Mechanism*

WANG Yan**, ZHOU Tong-Tong**, GUO Yuan, WANG Hai-Fang, CAO Ao-Neng***

(Institute of Nanochemistry and Nanobiology, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Graphical abstract



Abstract Objective This study employs a special conformational engineering (CE) technology to construct an α -chymotrypsin-like active center, which includes a catalytic triad, an oxyanion hole, and a substrate-binding site, on silver nanoparticles (AgNPs), thereby creating an AgNP-based artificial hydrolase with high catalytic activity. This study provides a new approach for the design of highly efficient artificial enzymes and enzyme-mimicking. **Methods** AgNPs were chosen as the scaffold to build the an α -chymotrypsin-like active center. A special CE procedure enables the designed peptide, Triad5, to adopt an α -helical conformation on AgNPs, with the key catalytic residues located on one side of the α -helix forming a catalytic active center with a catalytic triad, an oxyanion hole, and a substrate-binding site. The CE procedure consists of three steps, including conformation induction *via* trifluoroethanol (TFE), conformation stabilization on AgNPs *via* Ag-S bonds, and TFE removal *via* lyophilization. Circular dichroism (CD) spectra were used to confirm the formation and stabilization of the α -helix conformation. Mutations of the key residues combined with stopped-flow kinetic experiments were used to demonstrate the indispensability of each key residue and the synergistic effects among the catalytic triad, the oxyanion hole, and the substrate-binding site. **Results** CD spectra show that the designed Triad5 alone is in random coil conformation; when conjugated on AgNPs, Triad5 still remains largely unstructured; but after the CE

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32371318).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-21-66135277-102, E-mail: ancao@shu.edu.cn

Received: March 25, 2026 Accepted: May 21, 2026

treatment, Triad5 adopts a typical α -helical conformation on AgNPs as designed, thus produces an AgNP-based artificial hydrolase, Silverzyme. Silverzyme exhibits extremely high hydrolytic activity towards p-nitrophenyl acetate (p-NPA), with an extremely high catalytic turnover number per active site of 3.5 s^{-1} , which is even higher than that of α -chymotrypsin. As a comparison, the AgNP-Triad5 conjugate without CE treatment shows much lower catalytic activity than Silverzyme, highlighting the important role of the right conformation of the active center for the catalytic activity and the power of the CE treatment. When the key residues of the catalytic triad of Silverzyme were mutated to alanine, the overall catalytic efficiency of this mutant dropped by about 2 orders of magnitude, unambiguously demonstrating the key role of the designed catalytic triad. Similarly, when the residues for the oxyanion hole were deleted, the mutant with the intact catalytic triad also showed significantly decreased catalytic activity, highlighting the indispensable role of the oxyanion hole for the catalytic activity. Unexpectedly, when both the catalytic triad and the oxyanion hole were kept intact, a slight change of the binding site also resulted in significantly decreased catalytic activity, indicating that the designed binding site is at the right position to align the substrate in the right orientation in the active center for catalytic hydrolysis. These results confirm the synergy among the catalytic triad, the oxyanion hole, and the substrate-binding site, indicating successful mimicking of the active center of α -chymotrypsin. Moreover, Silverzyme shows better thermal stability than α -chymotrypsin, and can even hydrolyze the tough non-activated ester diethyl phthalate, a priority pollutant by the United States Environmental Protection Agency (USEPA). **Conclusion** This study successfully mimicked the complex catalytic active center of α -chymotrypsin using a conformational engineering strategy, and produced a highly active artificial hydrolase with a well-defined structure and catalytic mechanism. The findings highlight the significant potential of conformational engineering.

Key words conformational engineering, artificial enzyme, catalytic triad, enzyme-mimicking, silver nanoparticles

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0152

CSTR: 32369.14.pibb.20260152