

文章编号: 1004-5929(2008)02-0173-05

脱金属硫蛋白吸附在粗糙金表面的 表面增强拉曼光谱

高 宇¹, 崔 颜², 向 娟^{1*}, 任 斌^{2*}

(1. 中南大学化学化工学院生物传感所, 长沙 410083;

2. 厦门大学化学化工学院 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘 要: 利用表面增强拉曼光谱(SERS)技术研究了金属硫蛋白(MT)与脱金属硫蛋白(apo-MT)在粗糙金表面的吸附行为。结果表明: MT 通过氨基与金作用; apo-MT 与金的作用位点受制备方法影响; 在溶液中预制的 apo-MT 通过半胱氨酸残基的巯基与金结合, 在金表面制备的 apo-MT 通过氨基和巯基与金结合。SERS 更适用于研究 MT 的结构特征。

关键词: 表面增强拉曼光谱; 金电极; 脱金属硫蛋白

中图法分类号: O657.37 文献标识码: A

SERS Study of Apo-Metallothionein Adsorbed on Roughened Gold Surfaces

GAO Yu¹, CUI Yan², XIANG Juan^{1*}, REN Bin^{2*}

(1. *Institute of Surface Analysis and Biosensing, School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China;*

2. *Department of Chemistry, State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surfaces, Xiamen University, Xiamen 361005, China)*

Abstract: The adsorption of metallothionein and apo-metallothionein on roughened Au surfaces was studied by SERS technique. The results indicate that MT is adsorbed via $-\text{NH}_2$ group on roughened gold surfaces. The adsorption site of apo-MT on Au is determined by the preparation method of apo-MT. The apo-MT prepared in solution is adsorbed via the $-\text{SH}$ group on Au whereas that prepared on the Au surface is adsorbed via $-\text{SH}$ and $-\text{NH}_2$.

Key words: SERS; gold surface; apo-metallothionein

1 引言

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是1957年,由Margoshes和Vallee首次从马肾中分离出来,以后发现MT广泛存在于动植物和微生物

的组织中。金属硫蛋白是一种低分子量(约6000~7000 Da),富含半胱氨酸(20个)的蛋白质。它的半胱氨酸残基中的巯基可以结合多种重金属离子,如Zn(II), Cd(II), Cu(I), Hg(II)。目前,所了解的MT功能主要是:抗氧

收稿日期: 2008-02-20; 收修改稿日期: 2008-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(20503040, 20773165); 973计划(2007CB935603); 厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室开放课题项目资助

作者简介: 高宇, 硕士. E-mail: gaoyu810705@163.com

通讯作者: 向娟. E-mail: xiangj@mail.csu.edu.cn; 任斌. E-mail: bren@xmu.edu.cn

©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

化、清除自由基、驱除重金属毒物和平衡体内微量元素分布。MT 还与多种疾病密切相关,特别是 Alzheimer's 疾病, Parkinson's 疾病和 Menke's 症等一些神经退化性疾病^[1]。

MT 的结构与功能密切相关。天然的 MT 中络合了饱和的金属离子,因此不含有自由的巯基,也没有二硫键。但是,在一定的酸度条件下,MT 可以脱去结合的金属离子(apo-MT),从而生成自由的巯基。新产生的巯基迅速从蛋白内部翻转到外部,便于硫蛋白的再次结合金属离子^[2]。但是,自由的巯基容易氧化形成二硫键,从而导致蛋白质变性,失去络合金属离子的功能。因此,从分子水平认识 MT 的结构特征,对于理解 MT 的生物特性和生理功能具有重要意义。

激光拉曼光谱能从分子水平上获得各种物质详细的化学结构信息。它以信息丰富、制样简单、水的干扰小、破坏性小等独特的优点,在化学、材料、生物、医药卫生等领域得到广泛的应用。近年来,激光拉曼光谱已被越来越多的应用于 MT 的研究。Shi 等人应用 FT-Raman,对 $\text{Cu}_4\text{Zn}_3\text{-MT(III)}$, $\text{Cd}_5\text{Zn}_7\text{-MT(I)}$, $\text{Cd}_5\text{Zn}_7\text{-MT(II)}$ 和 $\text{Zn}_7\text{-MT(I)}$ 的固态样品进行了分析,得到了结合不同金属离子的 MT 的二级结构的信息^[3]。Domènech 等用同样的方法研究了软木橡树 MT(QsMT),结果表明:含 Zn 与含 Cd 的 QsMT 二级结构主要以 β 折叠(约 60%)的形式存在,而缺少 α 螺旋;而 Cd-QsMT 与 Zn-QsMT 相比, β 折叠的比例略有升高, β 转角相应减少^[4]。上述工作所选用的激发光波长为 1064 nm,功率为 100~200 mW。实验中如果选择固态样品,需要用到大量的样品;而如果采用较低浓度进行检测时,常规 Raman 的检测限又难以达到要求。表面增强拉曼光谱(SERS)技术利用 Ag 或者 Au 的粗糙的基底产生的表面增强效应,使得吸附在基底上分子的拉曼得到高达百万倍的增强,在单分子拉曼的检测中,增强因子更是高达 14 个数量级,有效地克服了普通 Raman 光谱灵敏度低的缺点,使得拉曼光谱在微量检测甚至单分子检测方面获得重要的应用^[5,9]。并且在溶液中生物样品有了水层的保护,可以减小了激光对样品的破坏,成为研究生物样品的一种有效的手段。

本文采用粗糙金电极作为 SERS 基底,应用表面增强拉曼光谱技术研究了溶液中金属硫蛋白(MT)与脱金属硫蛋白(apo-MT)在粗糙金表面的吸附行为。

2 实验

2.1 试剂

由兔肝提取的 $\text{Zn}_7\text{-MT(II)}$ (湖南麓谷生物科技有限公司),高纯盐酸(99.999%)和 NaCl(Alfa Aesar 公司)。其余试剂均为分析纯。所有溶液均用 $18.0 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 的超纯水配置。

2.2 仪器

拉曼光谱测量采用 LabRam I 型共焦显微拉曼系统(法国 Horiba/JY 公司),共焦显微物镜为 50 倍长焦镜头,谱仪的狭缝宽度为 $200 \mu\text{m}$,针孔大小为 $800 \mu\text{m}$,激发线为 632.8 nm,到达样品表面功率为 0.4 mW。SERS 基底的制备在 CHI631A 型电化学分析仪(上海辰华仪器公司)上进行。

2.3 SERS 基底的制备

工作电极是直径约为 2 mm 的多晶金电极(纯度 > 99.99%),辅助电极为铂环电极,参比电极为饱和甘汞电极。金电极使用前分别经 6 # 金相砂纸、 $1.0 \mu\text{m}$ 、 $0.3 \mu\text{m}$ Al_2O_3 粉抛光至镜面,置于超纯水中超声清洗 3 次。经超声清洗后的金电极先进行电化学清洗,电解质溶液为 $0.5 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$,扫描电位区间为 $-0.2 \text{ V} \sim 1.4 \text{ V}$,扫描速度 100 mV/s ,得到一稳定的氧化还原循环伏安图后转移入 0.1 mol/L 的 KCl 溶液中开始粗糙,起始电位为 -0.3 V ,以 1 V/s 的速度扫描到电位上限 $+1.2 \text{ V}$,并在此电位停留 1.2 s 之后再以 0.5 V/s 的速度回到起始电位,并且保持 30 s 让电极表面的氧化物得到充分的还原^[7]。如此循环 25 次,即可得到一暗红色的具有 SERS 效应的表面。基底用大量超纯水清洗后备用。

2.4 apo-MT 在 SERS 基底上的组装方法

所用 MT 溶液由 $\text{Zn}_7\text{-MT(II)}$ 溶于 10 mmol/L 的 NaCl 溶液中制得,浓度为 0.8 mmol/L 。去金属离子 MT(apo-MT)的组装方法分为两种:

1)表面制备法:首先将新制备好的 SERS 基底直接浸渍在 $\text{Zn}_7\text{-MT(II)}$ 溶液中 30 分钟,使

Zn₇-MT(II)充分吸附在基底表面;用大量超纯水冲洗掉表面剩余的溶液;然后将基底浸泡在 pH=2 的 HCl 溶液中 30 分钟,使 Zn₇-MT(II)中的 Zn²⁺完全解离,从而在 SERS 基底表面直接制得 apo-MT。将基底用大量超纯水冲洗后准备 Raman 光谱的检测。

2)溶液制备法:直接将 Zn₇-MT(II)溶液与 pH=2 的 HCl 混合 30 分钟,在溶液本体中直接制得 apo-MT;然后将新制备的 SERS 基底浸渍在制得的 apo-MT 溶液中 30 分钟使其充分吸附;用大量超纯水冲洗掉表面剩余溶液,准备 Raman 光谱的检测。

3 结果与讨论

图 1 是 Zn₇-MT 和 apo-MT 的结构示意

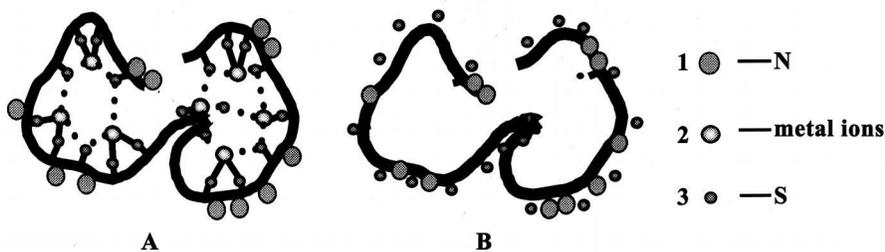


Fig. 1 The structure image of Zn₇MT (A) and apo-MT(B). Key: 1, N; 2 metal ions; 3 S.

图 2 分别列出了 Zn₇-MT(II)、以及采用两种不同方法制备的 apo-MT 在粗糙金表面的 SERS 谱图,三张谱图在低波数区域表现出明显差异。Zn₇-MT(II)(A)在 243 cm⁻¹处有一尖峰,280 cm⁻¹处有一强度较弱的宽峰;在金表面制备的 apo-MT(B)在 241 cm⁻¹处的峰略为降低,而 282 cm⁻¹处的宽峰相对强度比(A)明显增强;在溶液中预制的 apo-MT(C)在 240 cm⁻¹左右无明显的峰,而在 284 cm⁻¹处有一宽峰,有可能是 240 cm⁻¹与 284 cm⁻¹的峰叠加而成,但 240 cm⁻¹处峰的相对强度明显减弱。文献报道,240 cm⁻¹左右应为 Au-N 成键峰⁹,而 280 cm⁻¹左右应为 Au-S 成键峰⁴。由此可知,Zn₇-MT(II)在金表面以 Au-N 成键为主,辅以少量的 Au-S 成键;在金表面制备的 apo-MT 其 Au-S 成键的含量明显增加;而溶液中预制的 apo-MT 在金表面则主要以 Au-S 成键。这样

图。如图 1A 所示,MT 是一种高巯基含量的蛋白。二维 NMR 及 X 射线晶体衍射研究发现,Zn₇-MT 分子呈亚铃状,由 2 个大小相当(直径 1.52 nm)的结构域(α 和 β)构成,其中 C 端 α 结构域包含 11 个半胱氨酸(Cys),可以结合 4 个 Zn²⁺;N 端 β 结构域包含 9 个 Cys,3 个 Zn²⁺。Zn₇-MT 分子不含二硫键,也没有游离的巯基(-SH)存在,金属离子与巯基的结合使 MT 分子呈现出独特的金属硫四面体络合结构⁸。而当 MT 逐步脱去金属形成 apo-MT 时,其二级结构基本保持不变,只是脱去金属的游离巯基从蛋白质内部翻转到外部,如图 1B 所示⁴。

的表面成键差异是由 Zn-S 和 Au-S 的不同成键能力决定的。原始兔肝 Zn₇-MT(II)的半胱氨酸中的巯基都被 Zn²⁺络合,蛋白中没有自由的巯基(自由结构如图 1A 所示),因此,当它与粗糙金基底结合时,主要以氨基酸残基中的 N 原子与金作用,形成 Au-N 键。但是,由于 Zn²⁺与巯基的结合能力较 Au-S 弱,因此在与 Au 基底结合时,部分与金基底相邻且构型变化位阻小的 Zn-S 键容易断裂,从而生成少量的 Au-S 键(如图 2A 所示)。此时再用盐酸将残留的 Zn²⁺洗脱,半胱氨酸中的巯基迅速从蛋白内部翻转到外部,其中那些与金基底距离近,并且有足够的结合空间的巯基与金基底作用,形成 Au-S 键,因此,Au-S 键含量显著增加,如图 2B 所示。在溶液中预制的 apo-MT,其巯基已经完全翻转到蛋白外部(自由结构如图 1B 所示),与金基底结合时,由于 Au-S 成键要强于

Au—N 成键, 主要以 Au—S 键结合, 因此在图 2C 中, 主要是 Au—S 成键峰了。

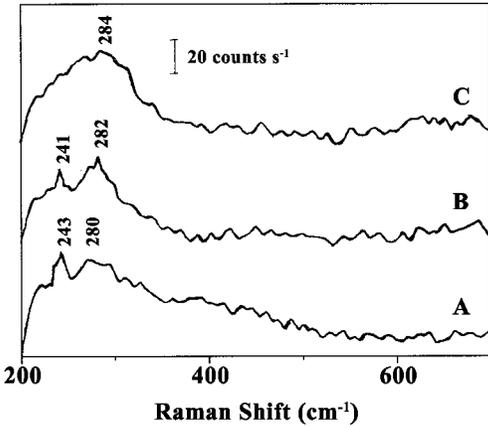


Fig 2 The SERS spectra of Zn_7 -MT(II) (A), apo-MT prepared on the surface of roughened Au substrate (B) and apo-MT prepared in the solution in advance and then dropped on the roughened Au substrate (C). The acquisition time was 10 s the laser power at the sample was 0.4 mW.

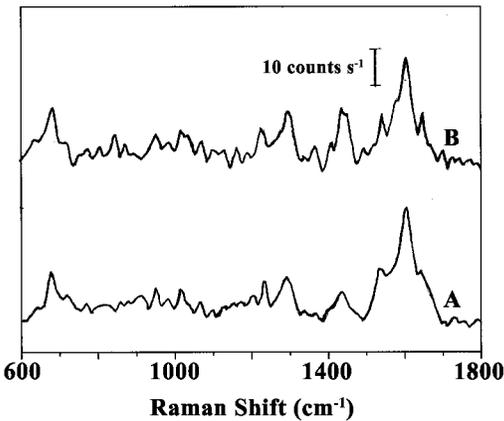


Fig 3 Time evolution of the SERS spectra of Zn_7 -MT(II) with 0.4 mW of laser power at the sample. The sampling interval is 5 min. The acquisition time for each spectrum was 10 s

根据固相 Raman 光谱的结果, MT 二级结构的特征谱峰主要出现在 $1500 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 范围^[3], 这一范围与生物样品的碳化区域 (1580 cm^{-1}) 相重叠。因此, 要研究 MT 的结构特征, 首先要避免它的碳化。Pettinger 等人认为, 有两种方法判断被分析物是否碳化^[10]。一是, 光谱

随时间的变化一般是瞬时的, 非破坏性的过程, 谱峰往往是明确的, 基本一致的。而碳化则意味着谱峰会产生重大的, 永久的改变。二是, 碳化往往在 1350 cm^{-1} 和 1580 cm^{-1} 左右有典型的 C 的宽带结构。

图 3 是 Zn_7 -MT(II) 随时间变化的表面增强拉曼光谱, 时间间隔为 5 min。从图中可以看出, 两次所采集的谱图变化很小, 可以认为 Zn_7 -MT(II) 基本没有碳化分解。

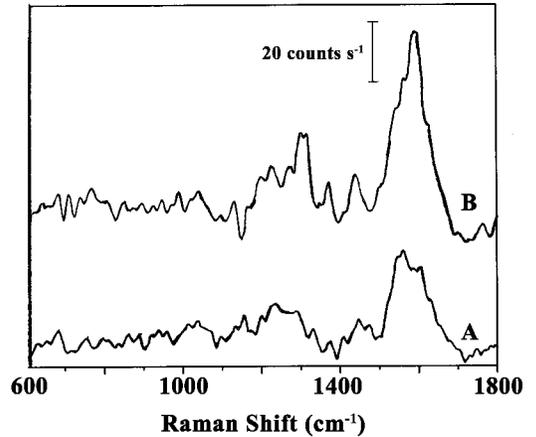


Fig 4 Time evolution of the SERS spectra of apo-MT prepared on the surface of roughened Au substrate with 0.4 mW of laser power at the sample. The sampling interval is 5 min. The acquisition time for each spectrum was 10 s

图 4 和图 5 分别为在金表面制备的 apo-MT 和在溶液中预制的 apo-MT 随时间变化的 SERS 谱图, 时间间隔均为 5 min。可以看到, 5 min 后, 在金表面制备的 apo-MT 在 1600 cm^{-1} 的宽峰明显增强(图 4); 而在溶液中预制的 apo-MT, 其 5 min 后的 SERS 图(B)与初始图(A)相比较, 不但 1600 cm^{-1} 的宽峰强明显增强, 而且出现了一些新的峰 (1307 cm^{-1} , 1622 cm^{-1}) (图 5)。以上现象说明, 随着时间的累积, apo-MT 已经逐步碳化分解。这是因为金属硫蛋白脱掉金属离子后, 其 20 个半胱氨酸中的巯基具有高活性, 容易被快速氧化及水解消化, 从而加速蛋白质的碳化^[2]; 而络合了金属离子的 MT, 由于没有游离的巯基, 能较稳定的存在于金表面。实验还发现: 改变激光功率和采谱时间, 在能得到 SERS 信号的实验条件下均能观察到 apo

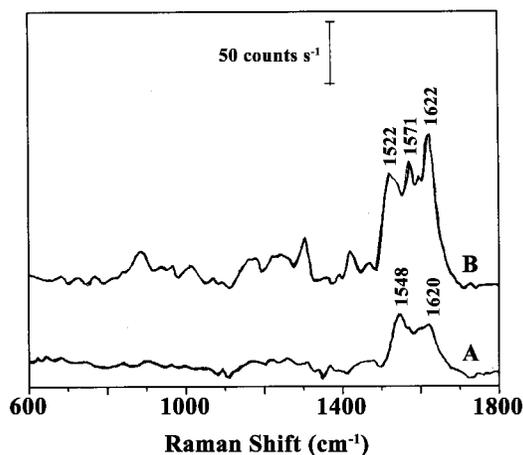


Fig 5 Time evolution of the SERS spectra of apo-MT prepared in the solution in advance with 0.4 mW of laser power at the sample. The sampling interval is 5 min. The acquisition time for each spectrum was 10 s

—MT 的碳化现象, 而过度的降低激光功率和减少采样时间, 会导致得不到 apo—MT 的 SERS 谱图。因此, 可以认为, SERS 可以应用于研究络合了金属离子的 MT 的二级结构的特征, 但是却不适合研究 apo—MT 的二级结构。

3 结论

本文研究表明, MT 通过氨基与金作用; apo—MT 与金的作用位点受制备方法影响; 在溶液中预制的 apo—MT 通过半胱氨酸残基的巯基与金结合, 在金表面制备的 apo—MT 通过氨基和巯基与金结合。SERS 可以应用于研究络合了金属离子的 MT 的二级结构的特征, 但是却不适合研究 apo—MT 的二级结构。

参考文献:

- [1] 张森. 金属硫蛋白、GroEL 及 DsbC 研究: 1. 金属硫蛋白通过锌离子的结合和释放调节氧化还原反应; 2. 一种非 ATP 酶依赖的 GroEL 的分子伴侣活力; 3. 大肠杆菌二硫键异构酶 DsbC 的折叠与去折叠[D]. 中国科学院生物物理研究所, 2001. 4—5.
- [2] Kelly E Rigby, M J Stillman. Structural studies of metal—free metallothionein [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 325: 1271—1278.

- [3] Shi Y B, Fang J L, Liu X Y, et al. Fourier transform IR and Fourier transform Raman spectroscopy studies of metallothionein—III: Amide I band assignments and secondary structural comparison with metallothioneins—I and II[J]. *Biopolymers* 2002, 65 (2): 81—88.
- [4] Donènech J, Tinti A, Capdevila M, et al. Structural study of the zinc and cadmium complexes of a type 2 plant (*Quercus suber*) metallothionein; Insights by vibrational spectroscopy [J]. *Biopolymers*, 2007, 86 (3): 240—248.
- [5] Grand J, de la Chapelle M L, Bijeon J L, et al. Role of localized surface plasmons in surface—enhanced Raman scattering of shape—controlled metallic particles in regular arrays [J]. *Phys. Rev. B: Condens. Matt. Mater. Phys.*, 2005, 72: 033407/1—033407/4.
- [6] Xu H, Bjerneld E J, Kal M, et al. Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced Raman scattering [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1999, 83: 4357—4360.
- [7] Tian Z Q, Ren B, Mao B W. Extending surface Raman spectroscopy to transition metal surfaces for practical applications. 1. Vibrational properties of thiocyanate and carbon monoxide adsorbed on electrochemically activated platinum surfaces [J]. *J. Phys. Chem. B* 1997, 101: 1338—1346.
- [8] Anthony Presta, David A Fowle, Martin J Stillman. Structural model of rabbit liver copper metallothionein [J]. *J. Chem. Soc., Dalton Trans* 1997: 977—984.
- [9] Jang N H. The Coordination Chemistry of DNA Nucleosides on Gold Nanoparticles as a Probe by SERS [J]. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2002, 23: 1790—1800.
- [10] Katrin F Domke, Zhang D, Bruno Pettinger. Enhanced Raman Spectroscopy: Single Molecules or Carbon [J]. *J. Phys. Chem. C* 2007, 111: 8611—8616.