

[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

金纳米粒子比色测定细胞色素 c 构象变化

栗娜 周剑章* 林玲玲 韩楠楠 林仲华

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

摘要: 金纳米粒子(Au NPs)的颜色会随着细胞色素 c (Cyt c)构象变化而发生较大的变化, 作者在改变原测定流程的基础上利用这种有规律的变化研究和测定了 H⁺和 L-半胱氨酸(L-Cys)对 Cyt c 的构象变化. 实验中分别加入 pH=1-13 的 Cyt c, 可以使 Au NPs 显示青、蓝、紫、红等明显不同的颜色, 从而可以利用 Au NPs 比色快速测定不同 pH 值的 Cyt c 构象变化. 在 pH=7 时, 当附加 L-Cys 浓度从低浓度变化到高浓度时, Au NPs 颜色逐渐从紫色变化到蓝色、青色, 从而实现利用 Au NPs 比色测定由 L-Cys 所引起 Cyt c 构象变化. 圆二色(CD)光谱证实了 pH=1-13 和不同浓度 L-Cys 下的 Cyt c 构象变化. 借助紫外-可见吸收光谱和扫描电子显微镜(SEM)进一步明确了加入 Cyt c 后 Au NPs 的不同聚集状态与其颜色变化的关系.

关键词: Au 纳米粒子; 比色测定; Cyt c 构象变化; pH 值; L-Cys

中图分类号: O648

Au Nanoparticles Based Colorimetric Detection of Conformational Changes in Cytochrome c

LI Na ZHOU Jian-Zhang* LIN Ling-Ling HAN Nan-Nan LIN Zhong-Hua

(Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemistry Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, P. R. China)

Abstract: The colors of Au nanoparticles (Au NPs) change along with conformational changes in cytochrome c (Cyt c). We exploited this property for the colorimetric detection of Cyt c conformational changes induced by H⁺ and L-cysteine (L-Cys). We improved the conventional procedure for this detection. After the addition of Cyt c within different pH values, the Au NPs are either cyan, blue, purple or red. This indicates that the Au NPs can be applied to the rapid colorimetric detection of pH-induced conformational changes in Cyt c. At pH 7 the color of Au NPs changes from purple to blue and then cyan upon the addition of L-Cys, which suggests that the Au NPs can be used for the colorimetric detection of Cyt c conformational changes caused by interaction with L-Cys. The conformational changes of Cyt c were verified by circular dichroism (CD) spectroscopy. The relationship between the aggregation states and colors of the Au NPs after the addition of Cyt c was characterized by UV-Vis absorption spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM).

Key Words: Au nanoparticle; Colorimetric detection; Conformational changes of Cyt c; pH value; L-Cys

自从 1996 年 Mirkin 等^[1]首次构筑了脱氧核糖核酸(DNA)-金纳米粒子(Au NPs)生物纳米复合体系以来, 近年利用 Au NPs 作为光学生物传感器成为研究热点^[2-4]. 鉴于其不同聚集状态时颜色不同, Au

NPs 比色测定已经广泛应用在金属离子^[5-7]、DNA^[8-9]、酶^[10-12]、蛋白质^[13-14]的检测和作用原理研究中. 细胞色素 c (Cyt c)是中心为血红素结构的低分子量蛋白, 在细胞呼吸链中担负着传递电子的重要作用. 在不

Received: March 8, 2010; Revised: April 22, 2010; Published on Web: July 16, 2010.

*Corresponding author. Email: jzzhou@xmu.edu.cn; Tel: +86-592-2189663.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (20603027, 20423002).

国家自然科学基金(20603027, 20423002)资助项目

同条件(如 pH 值、温度及氧化还原性物质共存)下, Cyt c 有着不同的构象^[15]. 研究 Cyt c 的构象变化对于理解其构象和其在生物分子中的功能之间的关系有着至关重要的作用. Zare 等^[16]利用 Au NPs 比色测定了不同 pH 时酵母菌细胞色素 c (Cyt c)的构象变化, 这也是第一次利用 Au NPs 比色测定蛋白质的构象变化. 而 Francoet 等^[17]分别研究了酵母菌和马心 Cyt c 在 Cyt c-Au NPs 复合体系中的表面性质.

然而, 之前的研究需要先制备稳定的 Cyt c-Au NPs 复合体系(要过夜), 再调节复合体系 pH 值^[16-17]. 作为一种检测方法而言, 这样的操作过程还是比较繁琐、耗时. 我们利用蛋白质构象变化延迟性的特点^[18], 改变了测定流程. 先将 Cyt c 调节到各个 pH 值, 后加入到 Au NPs 中, 虽然加入 Au NPs 后体系的最终 pH 值会改变, 但是 Cyt c 构象短时间内变化很小. 由此得到了一种利用 Au NPs 更简单, 更快速(1 min 内变色), pH 值范围更广泛(pH 为 1-13, 之前 pH 为 4-11), 颜色变化更多样的检测 H⁺引起的马心 Cyt c 构象变化的方法. 接着, 我们又利用 Au NPs 比色成功测定了在 pH=7 的条件下由 L-半胱氨酸(L-Cys)引起的马心 Cyt c 构象变化.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

氯金酸 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和柠檬酸三钠 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 购自北京化学制药厂, 分析纯; L-半胱氨酸(L-Cys)盐酸盐 $\text{C}_3\text{H}_7\text{ClNO}_2\text{S}$ 购自吉尔生化有限公司, 分析纯; 三羟甲基氨基甲烷(Tris)氢氧化钠、浓盐酸、氯化钠均购自国药集团分析试剂有限公司, 分析纯; 马心细胞色素 c (Cyt c 氧化型)购自 Sigma Chemical Co., 分析纯, 未经任何处理, 溶解在缓冲溶液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris + $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH=7)中以制备 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液. $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Cys 储备液的制备是将适量的 L-Cys 盐酸盐加入缓冲溶液中, 用 NaOH 调节至 pH=7. 实验用水为去离子超纯水 (Milli-Q, Millipore).

照片由日本佳能 IXUS 970 IS 型数码相机拍摄, pH 值由美国奥立龙 828 精密型酸度计测量得到. 紫外-可见(UV-Vis)吸收光谱由日本岛津公司 UV-2100 双池紫外-可见吸收光谱仪测量, 以超纯水作为参比溶液. 圆二色(CD)光谱是由日本分光株式会社 J-810 圆二色谱仪测量. 扫描电子显微镜(SEM)图是由日本日立公司 Hitachi S-4800 扫描电子显微

镜测试得到. 所有实验测试均在常温下进行.

1.2 实验过程

Au NPs 的制备: 利用文献方法^[19]合成, 在 250 mL 锥形瓶中分别加入 150 mL 超纯水, 将 1.815 mL 质量分数为 1% 的氯金酸溶液回流加热煮沸后, 加入 4.5 mL 质量分数为 1% 的柠檬酸三钠溶液回流加热至变为浅紫色后继续回流加热 50 min, 最终颜色为鲜红色. 冷却至室温后, 存储在冰箱(4°C), 待用.

H⁺引起的 Cyt c 构象变化的比色测定及表征: 首先用缓冲液稀释 Cyt c 储备液到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 HCl 和 NaOH 分别调节 pH 值到 1-6 和 7-13, 将制备好的样品进行 CD 光谱测试. 然后将 15 μL 不同 pH 值的 Cyt c 加入 400 μL Au NPs 中, 迅速混匀后观察其颜色变化(1 min 之内变色)并拍照, 后直接用于 UV-Vis 吸收光谱检测. 滴加含有 Cyt c 的 Au NPs 溶液到硅片上, 1 min 后, 用滤纸吸干, 并用超纯水洗净, 静置放干, 用于 SEM 图测试.

L-Cys 引起的 Cyt c 构象变化的比色测定及表征: 首先利用 L-Cys 储备液和 Cyt c 储备液制备含 L-Cys 的 Cyt c, 其中 Cyt c 浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 L-Cys 浓度分别为 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用于 CD 光谱测试. 将 15 μL 不同浓度 L-Cys 的 Cyt c 加入 400 μL Au NPs 中, 迅速混匀, 观察其颜色变化并拍照. 同上处理后用于 UV-Vis 吸收光谱和 SEM 测试.

2 结果与讨论

2.1 Au NPs 的制备与表征

图 1 的内插图 A 为 Au NPs 的 SEM 图, 可看出所制备 Au NPs 呈规则的球形, 分散性很好. 图 1 中 UV-Vis 吸收光谱图表明其最大吸收峰在 521 nm 处, 特征吸收峰尖锐. 所制备的 Au NPs 颜色鲜红, 相当稳定(见图 1 内插图 B).

2.2 Au NPs 比色测定不同 pH 值下 Cyt c 的构象变化

图 2 展示了不同 pH 值下不含和含 Cyt c 的 Au NPs 的照片. 上面一列是在 Au NPs 中分别加入单纯缓冲液(pH 从 1 到 13)的照片, 可以看到 Au NPs 显示红色, 说明 Au NPs 在此酸碱性条件下很稳定, 这与文献的结果^[16]一致. 而下面一列是含 Cyt c 的 Au NPs 照片, 可以看到加入不同 pH 值的 Cyt c 后, Au NPs 逐渐显示从青色到蓝色, 再到紫色, 最后为红色. Cyt c 的 pH=1 时, 呈现青色; pH=2 时, 呈现深蓝

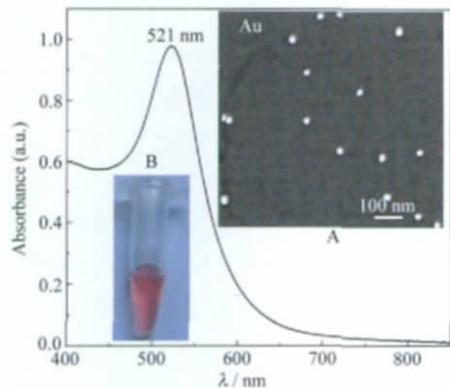


图1 Au 纳米粒子(NPs)的紫外-可见吸收光谱
Fig.1 UV-Vis absorption spectrum of Au nanoparticles (NPs)

Insets are SEM image (A) and the photo (B) of Au NPs.

色; pH=3-7, 呈现蓝色; pH=8-10, 呈现紫色; pH=11-13 时候, 呈现红色.

这些不同颜色体现了Au NPs不同的聚集状态, 蓝(青)色为深度聚集状态, 紫色为轻度聚集状态, 而红色则是分散状态. 图3的SEM图展示了分别加入pH值为1、4、7、11的Cyt c后Au NPs的形貌. 由图可见: pH=1时, Au NPs聚集程度最强; pH=4, 7时, 聚集程度较弱; 而pH=11时, Au NPs则处于分散状态, 这与其相应的颜色变化保持着高度的一致性.

图4(A)是加入不同pH值的Cyt c后Au NPs的UV-Vis吸收光谱(由于溶液中Cyt c的最终浓度很低, 其UV-Vis吸收峰被Au NPs的吸收峰所掩盖). 当加入pH值从1到10的Cyt c时, Au NPs第二等离子共振吸收峰(金纳米粒子聚集后由于相邻粒子间的等离子共振耦合而出现相对520 nm红移的新的等离子共振吸收峰)的峰位对应的波长逐渐从623 nm减小到577 nm, 而加入pH值从11到13的Cyt c时, Au NPs没有第二等离子共振吸收峰, 只有其521 nm处的特征吸收峰. 可以看出, pH=1-10时,

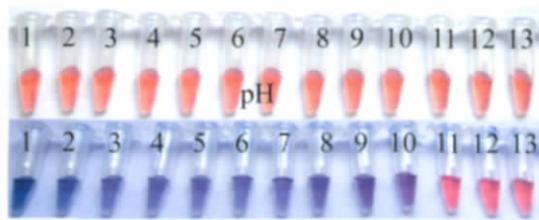


图2 不含(上列)和含(下列)Cyt c的Au NPs照片
Fig.2 Photos of Au NPs without (upper) and with (lower) Cyt c
pH: 1-13

吸收峰峰位变化较大; 而pH=11-13时, 对应峰位波长基本不变. 为了进一步比较Au NPs等离子共振吸收峰位与pH值的关系, 我们做了该峰位下波长与pH值的关系曲线(见图4(A)的内插图). 可以看出, pH从1到10变化时, 峰位波长随着pH值的变大而逐渐减小, 而pH从11到13时, 峰位变化很小, 基本趋于不变. 这跟其颜色从pH=1-10显示聚集态的青、蓝、紫色, 而pH=11-13显示分散态的红色是很一致的.

由于马心Cyt c主要是通过静电吸附在Au NPs上^[17], 所以当Cyt c的pH值低于其等电点(10-10.8)时, 带负电的Au NPs与带正电的Cyt c相互吸引, 从而Au NPs呈现聚集状态, 表现出紫色或者蓝(青)色; 相反, 当Cyt c的pH高于其等电点时, 带负电的Au NPs与带负电的Cyt c相互排斥, 从而Au NPs呈现分散状态, 表现为红色. 同时, 在不同pH值下, Cyt c构象会发生变化. pH=0.42-2.5时, Cyt c的疏水内核打开, 其为非折叠蛋白; pH=2.5-12.76时, Cyt c是折叠蛋白; 而高于12.76时为另一种非折叠蛋白^[15]. 本实验中是先将Cyt c调节到各个pH(模拟各实际情况)后加入到Au NPs中, 虽然加入Au NPs后体系最终的pH值会改变, 但是Cyt c构象短时间内变化很小. 我们的CD光谱实验证实, 加入Au

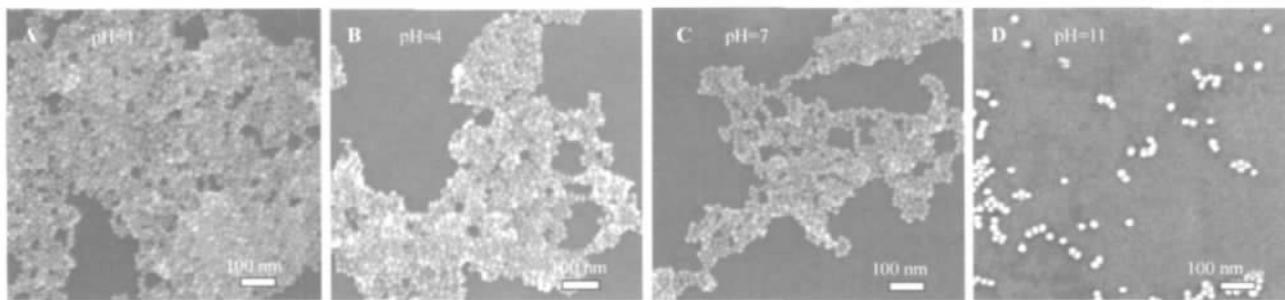


图3 含pH值分别为1, 4, 7, 11的Cyt c的Au NPs的SEM图
Fig.3 SEM images of Au NPs with Cyt c for pH=1, 4, 7, 11

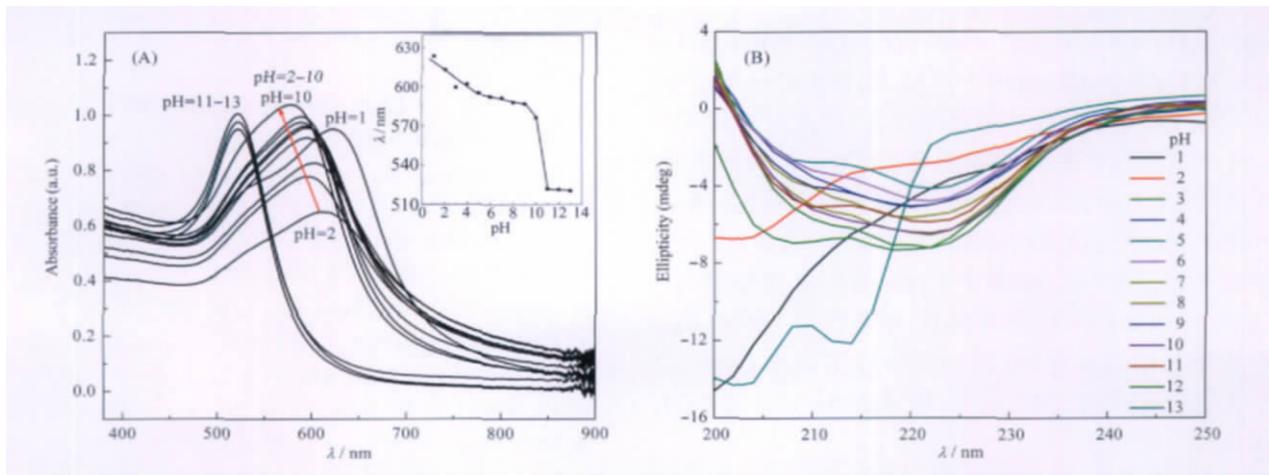


图 4 含 Cyt c 的 Au NPs 的 UV-Vis 吸收光谱(A)和 Cyt c 的圆二色光谱(B)

Fig.4 UV-Vis absorption spectra of Au NPs with Cyt c (A) and CD spectra of Cyt c (B)

Inset: the plot between wavelengths at absorption peaks with different pH values. The arrowhead points pH values from 2 to 10.

NPs 后, 在实验测试时间内, Cyt c 的构象基本保持不变. 图 4(B)是 pH=1-13 Cyt c 的 CD 光谱, 其中 208 和 222 nm 两处负峰是 Cyt c 的 α 高螺旋结构特征峰^[20]. 在 pH=3-12 时, 222 和 208 nm 处存在负峰, 说明 Cyt c 的 α 螺旋结构保持, Cyt c 为折叠蛋白; 而 pH=1-2 以及 pH=13 时, 两个负峰消失, 此时 Cyt c 处于两种不同结构的非折叠状态. 当 Cyt c 为 pH < 2.5 (pH=2, 1) 的非折叠蛋白构象时, Cyt c 带正电, Au NPs 呈现深蓝色和青色; pH 低于其等电点 (pH=3-10) 的折叠蛋白构象时, Cyt c 也带正电, Au NPs 呈现蓝色和紫色; pH 高于其等电点 (pH=11-12) 的折叠蛋白构象时, Cyt c 带负电, Au NPs 显示红色, 可见等电点前后变色尤其明显; 而 pH=13 的非折叠蛋白构象时, Cyt c 也带负电, Au NPs 也显示红色. 由此可见, 我们可以利用 Au NPs 比色快速灵敏地测定 pH=1-13 时 Cyt c 的构象变化.

2.3 Au NPs 比色测定 L-cys 引起的 Cyt c 构象变化

已有研究发现, Cyt c 电化学研究中所采用的有些促进剂 (如碘离子^[21]、胱氨酸^[22]) 可能会与 Cyt c 表面的赖氨酸作用进而引起 Cyt c 分子的构象发生微小的变化. L-Cys 也是一种 Cyt c 电化学活性的促进剂, 同时 Cyt c 中血红素能以共价键与蛋白链中的 L-Cys 相联^[15], 而 L-Cys 与 Cyt c 相互作用是否也会引起 Cyt c 构象的变化尚未见报道. 我们尝试通过 Au NPs 比色测定与 L-Cys 相互作用后 Cyt c 构象可能出现的微小变化, 并用 CD 光谱进行验证. 图 5(A) 的插图是含不同浓度 L-Cys 的 Cyt c 加入 Au NPs 中后的照片, 由图可见, 在无 L-Cys 时, Au NPs 为紫色; 低浓度 L-Cys 时, Au NPs 为深紫色、蓝色; 而高浓度 L-Cys 时, Au NPs 为青色. 图 5(A) 是相应的 UV-Vis 吸收光谱, 可见, L-Cys 浓度逐渐增大时, Au NPs 第二等离子共振吸收峰峰位逐渐从短波长 (560 nm)

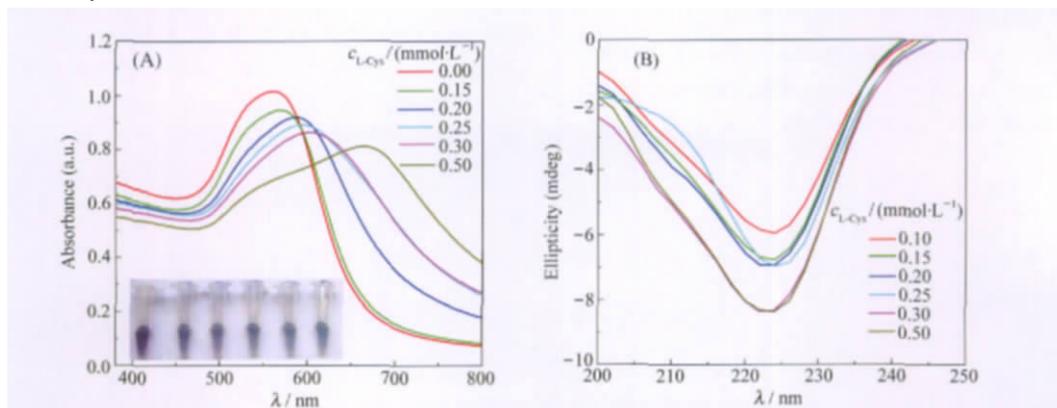


图 5 含 Cyt c 和 L-Cys 的 Au NPs 的 UV-Vis 吸收光谱(A)和含不同浓度 L-Cys 的 Cyt c 的 CD 光谱(B)

Fig.5 UV-Vis absorption spectra of Au NPs with Cyt c and L-Cys (A) and CD spectra of Cyt c with different concentrations of L-Cys (B)

Inset: photographs of Au NPs. From left to right, the concentrations of the L-Cys are 0.00, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.50 mmol·L⁻¹, respectively.

向长波长(664 nm)移动. 从图 5(B)对应不同浓度 L-Cys 时 Cyt c 的 CD 光谱中可见, 随着 L-Cys 浓度增加, 222 和 208 nm 处峰值逐渐增大, 据此可推测 Cyt c 的 α 螺旋随之逐渐加强, 在不含 Cyt c 的对照实验中, 单纯 L-Cys 并不能引起 Au NPs 颜色变化. 所以外加 L-Cys 所引起的 Au NPs 的颜色变化及 UV-Vis 吸收光谱的变化应来源于 Cyt c 的构象变化. 我们认为, 外加 L-Cys 和原来 Cyt c 中蛋白链上的 L-Cys 会竞争与血红素作用, 这种竞争作用致使 Cyt c 发生上述构象变化, 从而进一步导致 Au NPs 显色逐渐加深.

3 结 论

根据 Cyt c 构象变化能够引起 Au NPs 的聚集状态变化从而变色这一特性, 在改变原测定流程的基础上利用 Au NPs 比色测定了由 H^+ 和 L-Cys 引起的 Cyt c 的构象变化. 加入 pH 值分别从 1 到 13 的 Cyt c 可以导致 Au NPs 分别显示青、蓝、紫、红等颜色; 同时 pH=7 时, 当外加 L-Cys 从低浓度逐渐变化到高浓度引起 Au NPs 颜色逐渐从紫色变化到蓝色、青色. CD 光谱证实了不同浓度 H^+ 和 L-Cys 下 Cyt c 的构象变化, 同时 UV-Vis 吸收光谱中第二等离子共振吸收峰的移动和 SEM 图进一步明确了加入不同构象的 Cyt c 后 Au NPs 聚集状态的变化. 结果表明, 可以利用 Au NPs 比色测定的方法简单、快速地检测其他离子或分子与 Cyt c 的相互作用所引起的 Cyt c 构象的变化.

References

- 1 Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature*, **1996**, **382**(6592): 607
- 2 Katz, E.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2004**, **43**(19): 6042
- 3 Wang, Z.; Ma, L. *Coordin. Chem. Rev.*, **2009**, **253**(11-12): 1607
- 4 Zhao, W.; Brook, M. A.; Li, Y. *Chem. Bio. Chem.*, **2008**, **9**(15): 2363
- 5 Li, D.; Wieckowska, A.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2008**, **47**(21): 3927
- 6 Liu, J. W.; Lu, Y. *Chem. Commun.*, **2007**, (46): 4872
- 7 He, X. R.; Liu, H. B.; Li, Y. L.; Wang, S.; Li, Y. J.; Wang, N.; Xiao, J. C.; Xu, X. H.; Zhu, D. B. *Adv. Mater.*, **2005**, **17**(23): 2811
- 8 Sato, K.; Onoguchi, M.; Sato, Y.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *Anal. Biochem.*, **2006**, **350**(1): 162
- 9 Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, **120**(7): 1959
- 10 Guarise, C.; Pasquato, L.; Filippis, V. D.; Scrimin, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2006**, **103**(11): 3978
- 11 Liu, R. R.; Liew, R.; Zhou, J.; Xing, B. G. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2007**, **46**(46): 8799
- 12 Laromaine, A.; Koh, L. L.; Murugesan, M.; Ulijn, R. V.; Stevens, M. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, **129**(14): 4156
- 13 Tsai, C. S.; Yu, T. B.; Chen, C. T. *Chem. Commun.*, **2005**, (34): 4273
- 14 Shang, L.; Wang, Y.; Jiang, J.; Dong, S. *Langmuir*, **2007**, **23**(5): 2714
- 15 Huang, Z. X. Metal-protein in respiratory chain-cytochrome// Wang, K. Bioinorganic chemistry. 1st ed. Beijing: Tsinghua University Press, 1988: 121-128 [黄仲贤. 呼吸链中的金属蛋白-细胞色素. 王 夔. 生物无机化学. 第一版. 北京: 清华大学出版社, 1988: 121-128]
- 16 Chah, S.; Hammond, M. R.; Zare, R. N. *Chem. Biol.*, **2005**, **12**(3): 323
- 17 Gomes, I.; Santos, N. C.; Oliveira, L. M. A.; Quintas, A.; Eaton, P.; Pereira, E.; Francoet, R. *J. Phys. Chem. C*, **2008**, **112**(42): 16340
- 18 Chen, C.; Song, G. T.; Ren, J. S.; Qu, X. G. *Chem. Commun.*, **2008**, (46): 6149
- 19 Frens, G. *Nat. Phys. Sci.*, **1973**, **241**(1): 20
- 20 Valušová, E.; Švec, P.; Antalík, M. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, **14**(4): 621
- 21 Qu, X. G.; Jian, J.; Zhou, C. L.; Lu, T. H.; Huang, S. J. *Chem. J. Chin. Univ.*, **1994**, **15**(12): 1854 [曲晓刚, 剑 菊, 周成立, 陆天虹, 黄绍俊. 高等学校化学学报, **1994**, **15**(12): 1854]
- 22 Jian, J.; Qu, X. G.; Lu, T. H.; Wu, Y. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **1997**, **17**(1): 108 [剑 菊, 曲晓刚, 陆天虹, 吴 越. 光谱学与光谱分析, **1997**, **17**(1): 108]