

金纳米粒子共振光散射法测金属硫蛋白

薛金花, 李巧玲, 张锦泉, 王永生*

摘要: [目的] 建立并应用金纳米粒子共振光散射(RLS)法,测定人尿样中金属硫蛋白(MTs)的含量。[方法] 在pH 4.56的B-R缓冲液中,MTs与金纳米粒子结合形成较大聚集体,导致体系RLS增强,于545 nm波长处RLS强度与MTs的浓度有线性关系,据此建立测定MTs的新方法。[结果] 在最佳实验条件下,在545 nm波长处RLS强度与MTs在 $7.98 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ g/mL范围内线性关系良好,其线性回归方程为 $\Delta I_{\text{RLS}} = 16.69\rho - 23.09$,相关系数 $r = 0.9995$,检出限为 2.39×10^{-9} g/mL。[结论] 本方法操作简便、快速、仪器设备简单,检出限低,灵敏度高,可用于尿中痕量MTs的测定。

关键词: 金纳米粒子; 金属硫蛋白; 共振光散射

Determination of Metallothioneins by Resonance Light Scattering Method with Gold Nanoparticles XUE Jin-hua, LI Qiao-ling, ZHANG Jin-quan, Wang Yong-sheng* (School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China). *Address correspondence to WANG Yong-sheng; E-mail: yongsheng.w@tom.com

Abstract: [Objective] To establish a resonance light scattering(RLS) method for the determination of metallothioneins(MTs) based on the interaction of MTs with gold nanoparticles(GNPs). [Methods] In B-R buffer solution of pH 4.56, the conjugates of MTs-GNPs were formed by Au-S covalent bond between the mercapto group of cysteine of MTs and GNPs, resulting in the enhancement of RLS intensity of the system owing to their aggregating. RLS intensity linearly correlated with the concentration of MTs at $\lambda_{\text{max}} = 545$ nm, which suggested that a new method for determination of MTs could be established. [Results] Under the optimum conditions, there was a linear relationship between the RLS intensity and the concentration of MTs in the range of $7.98 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ g/mL at $\lambda_{\text{max}} = 545$ nm. The linear regression equation was $\Delta I_{\text{RLS}} = 16.69\rho - 23.09$ with a correlation coefficient of 0.9995, and the detection limit of 2.39×10^{-9} g/mL. [Conclusion] This method is simple, rapid, sensitive and accurate, and the detection limit is also low. It has been applied for detecting trace MTs in urine.

Key Words: gold nanoparticle; MTs; resonance light scattering

金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)是一种低分子量、高巯基含量,能大量结合重金属离子的蛋白质。目前,MTs作为重金属污染生物标志物的研究已逐渐成为环境科学、生物医学等研究领域的热点^[1]。迄今测定MTs的方法主要有金属亲和分析法、免疫法和高效液相色谱法。金属亲和分析法不需要特殊的仪器设备,操作简便,具有很高的重复性和准确性,但灵敏度不高,特异性差;免疫法特异性高,但存在交叉反应;高效液相色谱法^[2]操作简单,但一般实验室不易普及。本研究拟用金纳米粒子共振光散射法测定MTs,可为其标准方法的建立提供科学依据,也可探讨尿样中检测MTs的方法。因此,探索建立一种简便、灵敏、快捷、易普及的检测方法具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

F-4500型荧光分光光度计(日本日立);AY120电子天平

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(编号: 03JJY3030);衡阳市基础研究计划项目(编号: 2009KJ01)

[作者简介] 薛金花(1976—),女,硕士;研究方向:环境中有毒有害物质的检测

[*通信作者] 王永生教授; E-mail: yongsheng.w@tom.com

[作者单位] 南华大学公共卫生学院,湖南 衡阳 421001

(SHIMADU CORPORATION, JAPAN); PB-20酸度计(上海雷磁仪器厂);高速低温离心机(美国索福公司 Sorvall fresco);UV8500型紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);金属硫蛋白标准品;氯金酸溶液;柠檬酸三钠等。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制 MTs标准储备液:准确称取1.0 mg MTs于小烧杯中,用水溶解后,转移至100 mL容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,所得溶液浓度为10 μ g/mL,标准应用溶液由标准储备液逐级稀释至 1.00×10^{-8} g/mL、 1.00×10^{-9} g/mL;金纳米粒子(GNPs):将100 mL 0.1 g/L氯金酸溶液加热至沸腾,然后迅速加入3.5 mL 10 g/L柠檬酸三钠水溶液,继续加热同时迅速搅拌7~8 min后,再冷却至室温后稀释至吸光度为1.000后备用,该金纳米粒子浓度为0.1 g/L^[3];B-R缓冲溶液(Britton-Robinson):视pH不同,100 mL B-R母液加入适量NaOH(调到所用的pH值)与0.4%聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, PVA)

1.2.2 共振光散射强度的测定 在2 mL EP管中依次加入0.1 g/L金纳米粒子溶液100 μ L, pH 4.56的B-R缓冲溶液200 μ L,一定量的MTs标准工作溶液,及0.4%的PVA溶液30 μ L,用蒸馏水定容至刻度、摇匀。常温反应25 min,然后在F-4500荧光分光光度计上以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 进行扫描,得到共振光散射光谱。在波长545 nm处测量溶液的共振光散射强度 I_{RLS} 和试剂空白 I_0 ,得到

$\Delta I_{RLS} = I_{RLS} - I_0$ 。激发和发射狭缝宽度始终为 10 nm, 光电倍增管 (PVM) 负电压 400 V。

2 结果

2.1 光谱特征

图 1 为 GNP 的吸收光谱和 GNP-MT 的共振光散射 (RLS) 光谱。由图 1 可知 GNP-MT 的 RLS 体系的最大散射峰为 545 nm, GNP 的吸收峰在 520 nm 左右, 体系的 RLS 峰位于 GNP 的吸收峰附近。由图 2 可见, 在实验条件下, MT 在 200~700 nm 范围内几乎没有散射峰, GNP 在 545 nm 有 RLS 峰, 但 RLS 强度比较弱。而 MT 一旦与 GNP 混合, 就会在 250~600 nm 范围内出现一个宽大的散射光谱带, 且在 545 nm 左右出现一个尖锐的散射峰, 这说明 MT 与 GNP 已经发生了相互作用。随着 MT 的加入量增加, RLS 的强度也相应增强。

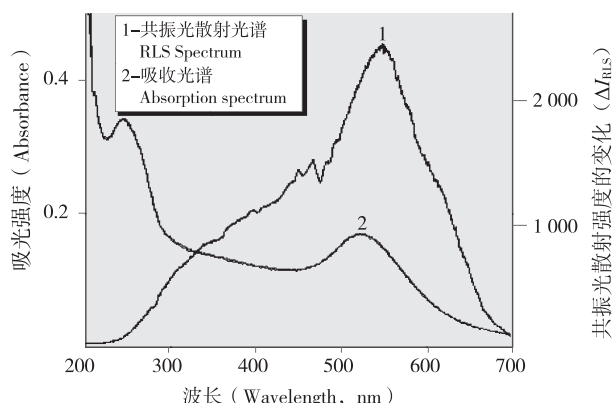
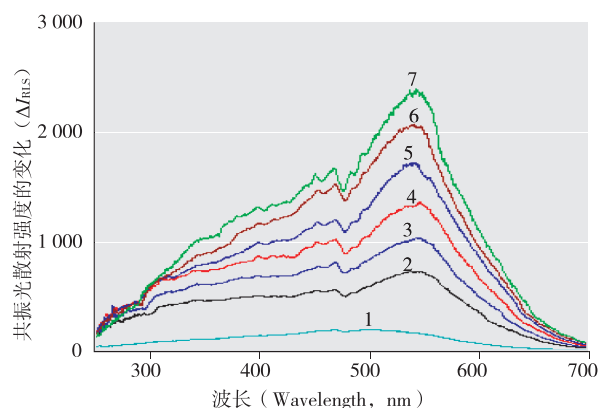


图 1 GNP-MT 体系的 RLS 光谱 (1) 和吸收光谱 (2)

Figure 1 Resonance light scattering (RLS) spectrum (1) and absorption spectrum (2) of GNP-MT system



[注] 1. MTs; 2~7: GNP-MT, MTs 浓度 ($2 \sim 7 \times 10^{-12}$ g/mL): 0; 20; 40; 60; 80; 100

[Note] 1. MTs; 2-7 GNP-MT, the concentration of MTs ($2 \sim 7 \times 10^{-12}$ g/mL): 0; 20; 40; 60; 80; 100

图 2 MTs 检测体系的 RLS 图

Figure 2 Resonance light scattering spectrum of MTs detection system

2.2 试剂用量选择及影响因素

2.2.1 缓冲液对体系 RLS 强度的影响 本研究试验了 Tris-HCl, Britton-Robinson (B-R) 和 HAc-NaAc 缓冲液, 结果表明, 体系在 B-R 缓冲液中, ΔI_{RLS} 最大, 灵敏度最高, 且 ΔI_{RLS} 与 MT 的浓度线性关系最好。然后进一步试验不同 pH 值的影响, 结果如

图 3, 当 pH 为 4.56 时, 体系的 ΔI_{RLS} 最大, 超出此 pH 时, ΔI_{RLS} 值显著下降。所以本实验选择 pH 4.56 的 B-R 缓冲液控制体系的酸度。

2.2.2 B-R 缓冲溶液用量对体系 RLS 强度的影响 如图 4 所示, 当加入 pH 4.56 的 B-R 缓冲液为 200 μ L 时, 体系的 ΔI_{RLS} 最大; 如果继续增大缓冲液的用量, 发现体系 ΔI_{RLS} 变化不大, 而空白值却有增加趋势。所以实验选择浓度为 pH 4.56 的 B-R 缓冲液 200 μ L。

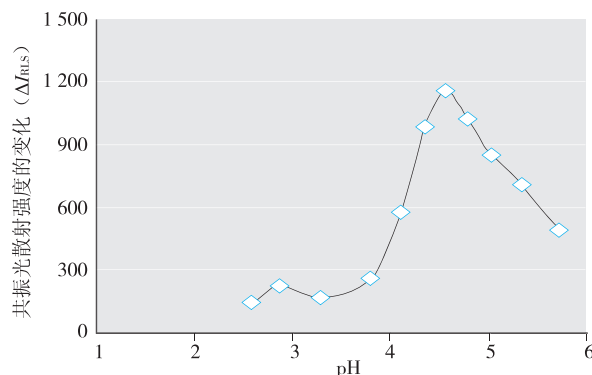


图 3 pH 值的影响

Figure 3 Effect of pH on the intensity of RLS

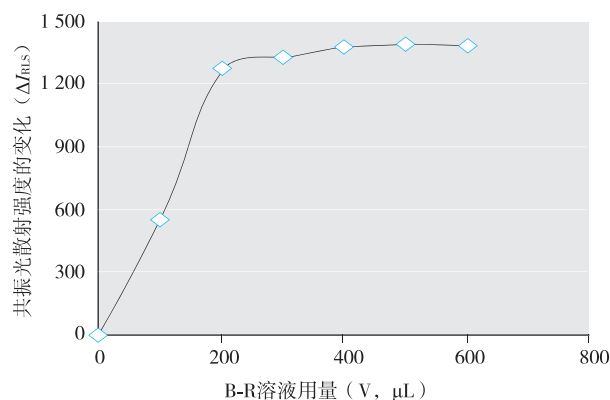


图 4 B-R 用量

Figure 4 Effect of B-R volume on the intensity of RLS

2.2.3 金纳米粒子及表面活性剂的影响 在最佳实验条件下, 试验了金纳米粒子用量对反应体系的影响, 如图 5, 金纳米粒子用量在 100 μ L 时, I_{RLS} 最大且随着用量的增加 I_{RLS} 反而降低, 所以实验选择金纳米粒子加入量为 100 μ L。

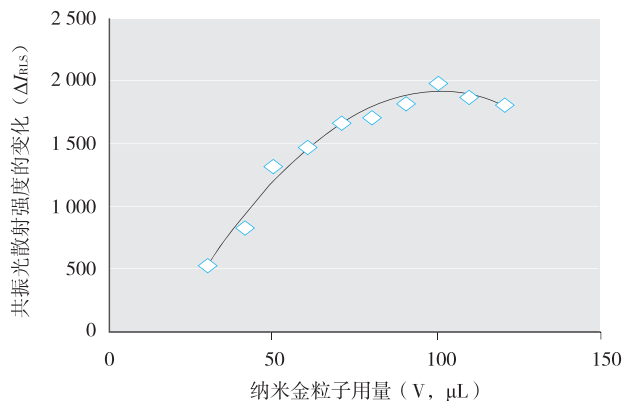


图 5 金纳米粒子用量的影响

Figure 5 Effect of GNP volume on the intensity of RLS

分别试验了十二烷基硫酸钠(SDS), 溴化十六烷基三甲基铵(CTMAB), 吐温-20和聚乙烯醇(PVA)四种表面活性剂对MTs-GNPs体系的影响。结果发现, 合适浓度下的PVA在增加体系的灵敏度、稳定性之同时且空白值较低, 故选择PVA作为增稳剂。然后进一步试验了不同0.4% PVA用量对体系的影响, 实验结果如图6所示, 0.4% PVA溶液用量为30~80 μL 时, 体系的 ΔI_{RLS} 最大值出现在30 μL 时。故实验选择浓度为0.4%的PVA用量30 μL 。

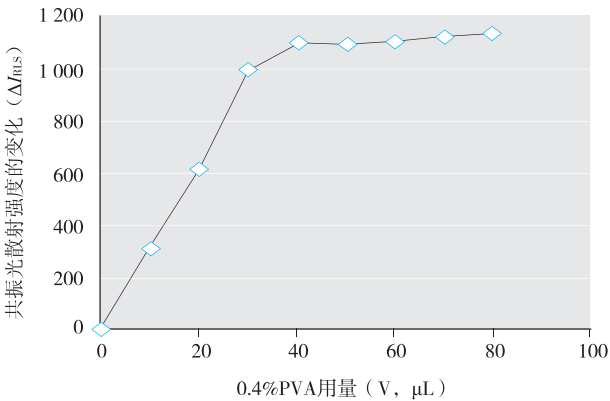


图6 PVA用量的影响

Figure 6 Effect of PVA volume on the intensity of RLS

2.2.4 试验温度及时间的选择 按照实验方法配制溶液, 分别控制反应体系的温度在4~60℃范围内, 发现随着温度的升高, 反应加快。当反应温度为20℃时体系的 ΔI_{RLS} 值最大, 而后随着温度的增加反应速率增加, 但 ΔI_{RLS} 却减小(因为 I_{RLS} 的增加, 空白值也增加), 使得灵敏度降低, 故选择20℃作为反应体系的最佳温度。

固定已优化的实验条件, 改变反应时间, 结果表明, 在2~40 min内 ΔI_{RLS} 随着反应时间的增加而变化, 在25 min左右达到最大值, 故选择反应时间为25 min。

2.3 共存物质的影响

GNPs及MTs的浓度分别为0.01 g/L和 5.0×10^{-8} g/mL, 考察了尿样中可能存在的干扰物质对测定结果的影响, 在相对标准偏差不大于 $\pm 5\%$ 时, 所得实验结果如表1。结果表明共存物质对MTs测定影响较小, 本方法抗干扰能力强。

表1 共存物质的影响

Table 1 Tolerance of foreign substances

干扰物	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺	Fe ²⁺	柠檬酸	BSA	色氨酸	精氨酸	甘氨酸	肌酸	尿素
浓度(g/L)	600	50	400	40	300	1320	20	1000	1150	1000	110	2000
RSD(%)	3.5	2.1	2.8	-2.9	-1.4	3.6	-1.9	3.4	4.7	1000	-5.2	3.8

2.4 标准曲线、检出限及精密度

2.4.1 标准曲线的建立 在最佳实验条件下, 分别取1.00($\times 10^{-9}$ g/mL)MTs标准工作液0.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0 μL 于EP管中, 并定容至2 mL。按实验优化的条件, 分别测定共振光散射强度, 以 ΔI_{RLS} 对MTs质量浓度绘制工作曲线(图7)。试验结果表明, MTs浓度在 7.98×10^{-9} ~ 1.0×10^{-7} g/mL范围内与共振光散射强度呈现良好的线性关系。经数据处理得MTs回归

方程为 $\Delta I_{\text{RLS}} = 16.69\rho - 23.09$, 相关系数 $r = 0.9995$ 。

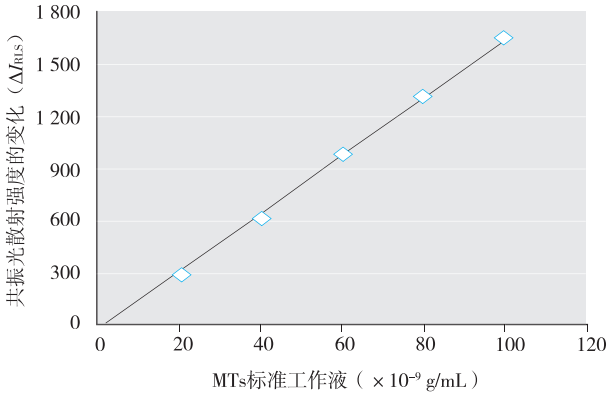


图7 MTs检测体系的标准曲线

Figure 7 Standard curve of MTs detection system

2.4.2 检出限和精密度 按实验方法进行11次空白平行测定, 按照 $C_L = 3S_b/k$ (其中 S_b 表示空白溶液的标准偏差, k 表示工作曲线的斜率)公式计算出MTs的检出限为 2.39×10^{-9} g/mL。分别对MTs为 3.0×10^{-8} g/mL和 6.0×10^{-8} g/mL的两种标准溶液进行7次平行测定的相对标准偏差分别为1.91%和5.81%, 实验结果充分表明本方法精密度良好。

2.5 样品分析及回收率测定

2.5.1 样品处理 本实验参照文献[4]的方法采用碱水解法处理尿样, 并作适当改进, 具体操作如下: ①取一定体积尿样充分混匀后, 加入等体积0.01 mol/L pH 8.16 Tris-HCl缓冲液, 摇匀, 离心(4℃, 4000 r/min, 20 min)。②取上清液80℃加热10 min, 冷却到4℃离心(同前)。③取上清液加入到3倍体积-20℃的无水乙醇中, 置-20℃过夜, 再离心(4℃, 4000 r/min, 30 min)。④取沉淀溶于一定体积pH 8.16 Tris-HCl缓冲液中, 离心(4℃, 4000 r/min, 20 min)。⑤取上清液加入到3倍体积-20℃的无水乙醇中, 置-20℃冰箱。再于4℃离心(4000 r/min, 30 min)。⑥取沉淀于通风处除去乙醇, 溶于一定体积的水, 离心(4℃, 4000 r/min, 30 min), 弃沉淀, 取上清液测定。

2.5.2 尿样分析及回收率试验 本实验分析了3份正常尿样, 在优化实验条件下, 每份样品做6次平行测定, 实验结果如表2。

表2 样本测定结果

Table 2 Results of the determination samples (n=6)

尿样 Sample No	测定值 ($\times 10^{-9}$ g/mL)	加标值 ($\times 10^{-9}$ g/mL)	总值 ($\times 10^{-9}$ g/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
1	17.38	50.00	65.65	96.54	5.11
2	2.94	50.00	53.85	101.82	4.83
3	14.57	50.00	60.92	92.70	3.24

3 讨论

MTs分子呈椭圆形, 有两个结构域, 相对分子量为6000~7000, 直径30~50 Å, 含有61个氨基酸, 其中20个氨基酸为半胱氨酸, 少数有21个, 每一个MTs分子可以结合7~12个金属离子。半胱氨酸在蛋白质中经常以其氧化型的胱氨酸存在。胱氨酸由两个半胱氨酸通过它们侧链上的巯基氧化成共价的二硫键连接而成。半胱氨酸分子中有一个巯基和一个氨基, 可以通过其巯基与金纳米粒子形成Au-S共价键而结合^[5]。另一方

面,半胱氨酸的氨基在 pH 5.0 时带正电荷,而金纳米粒子因为表面包覆了柠檬酸根离子带负电荷^[6],因此半胱氨酸与金纳米粒子之间还有静电引力作用。最终,金纳米粒子通过半胱氨酸中巯基和氨基而互相结合在一起,形成聚集体。根据实验现象和结果推测,MTs 分子中带正电荷的氨基与金纳米粒子表面的负电荷通过静电引力作用结合,同时 MTs 中的半胱氨酸巯基与金纳米粒子以 Au-S 共价键结合,即 MTs 通过这两种作用力使金纳米粒子聚集,形成一种空间网状结构,导致 RLS 强度显著增强。由于 RLS 作用包括散射-吸收-再散射的过程,所以根据 RLS 理论^[7],体系增强的散射光谱可认为是 RLS。根据 RLS 法定量原理^[8]本研究建立了一种 RLS 法检测 MTs 的新方法。

金纳米粒子 RLS 法测定尿中痕量 MTs,方法简便、快速、灵敏度高,仪器设备简单,试剂稳定、廉价易得。用于尿样中 MTs 测定,获得比较满意的结果,方法实用可行。MTs 作为重金属污染物、潜在重金属污染暴露和毒性效应早期预警的主要生物标志物,以及环境中重金属污染胁迫与风险评价的分子生态毒理学诊断指标,对制定预防性的管理措施,及时监控环境污染具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 陈亮,金泰虞,常秀丽,等.尿金属硫蛋白作为职业铜接触生物标志物的研究[C].第四届全国环境与职业医学研究生学术研讨会

论文集,2005: 85-91.

- [2] ALHAMA J, ROMERO-RUIZ A, LOPEZ BAREA J. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization[J]. J. Chromatogr. A, 2006, 1107: 52-58.
- [3] 徐玉梅.金纳米粒子的制备及表征[J].甘肃科技,2008,24(13): 74-75.
- [4] 薛金花,王永生,欧阳运富,等.茜素红共振光散射法检测金属硫蛋白[J].中国卫生检验杂志,2007,17(2): 197-198.
- [5] P.K.SUDEEP, S.T.SHIBU JOSEPH, K. George Thomas, Selective detection of cysteine and glutathione using gold nanorods[J]. J. Am. Chem. Soc, 2005, 127: 6516-6517.
- [6] 李正平,段新瑞,白玉惠.基于金纳米粒子自组装的分光光度法测定半胱氨酸[J].分析化学,2006,34(8): 1149-1152.
- [7] 王康林,任吉存.共振散射相关光谱一种新的单颗粒探测方法[J].高等学校化学学报,2009,30(7): 1305-1308.
- [8] LIU S, YANG Z, LIU Z, et al. Resonance Rayleigh-scattering method for the determination of proteins with gold nanoparticle probe[J]. Anal Biochem, 2006, 353: 108-116.

(收稿日期: 2010-06-25)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 洪琪; 校对: 徐新春)

【告知栏】

《环境与健康展望(中文版)》(CEHP)杂志数码版将与读者见面

《环境与健康展望》(*Environmental Health Perspectives, EHP*)杂志是由隶属于美国卫生与人类服务部的国立卫生研究院下属环境健康科学研究所出版的专业月刊。*EHP* 杂志的宗旨是刊登环境健康领域中最全面、优秀和客观的专业论文以及该领域最新、最翔实的新闻,受到全球广大环境与健康科研人员、学者以及关心环境与健康问题的有识之士的关注,为学术界、政府、立法机构以及大众搭建了一个探讨环境与人类健康关系的交流平台。

为了服务中国读者,*EHP* 杂志于 2001 年将其英文版的部分内容译成中文,推出了该刊的中文版服务。为了继续向中国读者提供最新、最前沿的环境与健康信息,宗旨,*EHP* 杂志编辑部于 2004 年与上海市疾病预防控制中心合作编辑出版 *EHP* 中文版。目前该刊中文版在中国大陆已有读者 3 万余名。2010 年,*EHP* 杂志成功推出英文数码版,为众多的读者带来阅读和查阅信息的便利,将环境与健康信息更快、更有效地传递到读者手中。为了更好地传播、普及、推广环境与健康知识,将环境与健康信息传播到更广阔的地区和更广泛的人群,上海市疾病预防控制中心与 *EHP* 杂志编辑部决定,从 2011 年 2 月开始,*EHP* 中文版将从原来的季刊改为双月刊,并推出中文数码版,以更多、更好、更及时地为中国读者提供环境与健康知识。

如您需要阅读 *EHP* 中文数码版可登陆 <http://www.ehp-chinese-digital.com/ehp-chinese>,所有 *EHP* 出版内容均可在 <http://www.ehponline.org/> 免费获得,Brogan & Partners Convergence Marketing 负责 *EHP* 的宣传以及新闻发布,您也可通过 cehp@scdc.sh.cn 或 021-62758710 联系上海市疾病预防控制中心 *EHP* 中文版编辑部,获得您所需要的信息。期待在今后中文版的工作中继续得到您的支持。

上海市疾病预防控制中心 *EHP* 中文版编辑部

二〇一〇年十二月