

摘要

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 是一类能够调节必需金属代谢和重金属解毒的金属蛋白质, 它对金属离子的捕获, 释放和转移行为都是动态的细胞过程。实时监测这一系列过程中蛋白质的结构变化对研究这类蛋白质的结构与功能之间的关系具有深远的生物学意义。

本文我们引入扫描电化学显微镜 (Scanning Electrochemical Microscopy, SECM) -表面等离子体激元共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 联用技术, 实时研究了表面固定的硫蛋白与 Cu^{2+} 的相互作用过程。结果表明, 这一新型联用技术不仅能够控制金属键合的程度, 还能检测硫蛋白与金属离子的结合情况以及相关动力学过程。本文对脱金属硫蛋白 (apo-metallothionein, apo-MT) 捕获 Cu^{2+} 以及 MT 释放 Cu^{2+} 的分步过程进行了解释, 说明了三个稳态结构所包含的不同金属离子个数 5、9、12, 并对结合过程进行了动力学分析。另外, 由于在固体电极上原始状态下的 MT 的伏安信号通常不明显, 因此, 本文的研究使这一联用技术的应用范围也得到了拓展, 即可对不具电化学活性的蛋白质进行研究。

在此基础上, 我们将这一研究模型应用到检测 apo-MT 与 Hg^{2+} 的结合作用。实验测得 apo-MT 对 Hg^{2+} 的饱和结合数为 18; 当 Hg^{2+} 的量为 apo-MT 的 120 倍时, MT 结构遭到破坏。

关键词: 扫描电化学显微镜-表面等离子体激元共振联用技术, 金属硫蛋白, 铜离子, 汞离子, 动力学

ABSTRACT

Metallothioneins are a class of metalloproteins that play an important role in essential metal regulation and heavy metal detoxification. The activity of metal ion sequestration, release, and transfer by MTs are dynamic cellular processes. Detecting the structure changes during the dynamic processes is of immense biological importance for unraveling the protein structure/function relationship. However, many traditional techniques monitoring changes either in solution or in the solid state are not amenable for studies of rapid functional and dynamic changes of proteins at the solid/liquid interface. Furthermore, there are certain inherent limitations.

We describe herein the real-time SECM-SPR detection of interaction between copper ion and surface-confined MT. It is shown that not only did the couple technique enable us to control the extent of metal binding, but also allowed the binding stoichiometry and dynamics to be quantitatively determined. It reveals that copper ion sequestration by apo-MT and copper ion release by MT are both stepwise processes, leading to three stable structures containing different numbers of metal ions, which are $\text{Cu}_5\text{-MT}$, $\text{Cu}_9\text{-MT}$, $\text{Cu}_{12}\text{-MT}$, respectively. Since MTs in their native structure generally do not exhibit well-defined voltammograms at solid electrodes, our work expands the application of SECM-SPR from studies of redox proteins to proteins that do not undergo facile electron transfer reactions.

After this, the research approach is applied to detect the process of mercury sequestration by apo-MT. It shows that MT reaches the saturation state, when the molar ratio of Hg^{2+}/MT is up to 18. When the ratio is beyond 120, the structures/compositions of MT turn out to be destroyed.

KEY WORDS: SECM-SPR, metallothionein, copper ion, mercury ion, kinetics

原创性声明

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中南大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名： 辛银玲 日期： 2009 年 05 月 25 日

学位论文版权使用授权书

本人了解中南大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文并根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保存学位论文。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。

作者签名： 辛银玲 导师签名 向娟 日期： 2009 年 5 月 26 日

第一章 绪论

联用分析技术是当前仪器分析的重要发展方向,它将几种方法结合起来,汇集了各自的优点、弥补了各自的不足,从而更好的完成试样的分析任务。在表面分析方面,扫描电化学显微镜(Scanning Electrochemical Microscopy, SECM)和表面等离子体激元共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)都是较为成熟的分析技术,他们各自在生物、化学、医学、制药等领域都有着较为广泛的应用,是表面微区检测强有力的工具。迄今为止,它们曾分别与多种分析技术相结合。

就 SECM 而言,它在开始应用的阶段,就已经与多种表面分析技术联用,用于研究氧化还原诱导的表面反应、吸附剂的性质以及所选技术的性能评估^[1-9],如 SECM-石英晶体微天平^[1, 3, 4]、SECM-电化学发光^[2]和 SECM-光学显微镜^[5]、SECM-光电化学显微镜^[10]、SECM-原子力显微镜^[6]、SECM-电化学隧道显微镜^[11]和 SECM-微电极电位测定法^[9]等。推动这种联用技术发展的动力来源于在获得电化学信息的同时需要对界面现象进行寻址,以及实现 SECM 探针电极在诱导局部反应并可控地制造微型表面图样方面的普适性的需求^[12]。

近年来,与 SPR 相关的联用技术迅速发展起来,如流动注射-SPR^[13]、近红外 SPR 成像技术^[14]、SPR-荧光光谱法^[15]、SPR-石英晶体微天平^[16]、电化学(Electrochemistry, EC)-SPR^[17]、SPR-质谱^[18]等。其中,表面等离子体激元共振技术与电化学相结合(EC-SPR)为探测吸附物的光学与电学特性提供了可行的途径,并为定量分析伴随氧化还原反应发生的超薄薄膜的厚度变化提供了灵敏的检测方法。然而,在经典电化学-SPR 实验中,施加在 SPR 基底表面的电位会改变基底电子密度并造成 SPR 共振角位移^[102,103]。

SECM-SPR 新型联用技术^[12]的建立正是为了避免在 SPR 基底施加电位而引起电子密度或 SPR 共振角位移变化,而利用 SECM 电化学技术诱导基底表面的局部反应,使这一联用技术能够避免某些表面参数发生变化,从而使数据分析简化。

1.1 扫描电化学显微镜-表面等离子体激元共振联用技术

扫描电化学显微镜-表面等离子体激元共振(SECM-SPR)作为一种新型表面分析联用技术^[12],利用了 SECM 的微米级空间分辨率、表面电化学活性测量等功能和 SPR 的亚埃米级厚度检测限的优点,同时弥补了 SECM 灵敏度低,不

能获得表面吸附的分子构型变化信息,以及 EC-SPR 的金属基底电场变化对等离子体激元密度影响等方面的不足,将溶液中微区选择性诱导和表面高灵敏检测相结合,从而实现高选择、原位、动态的现场研究。

1.1.1 联用技术的发展概况

电化学-表面等离子体激元共振 (EC-SPR) 是电极/溶液界面实时表征和处理的有力工具^[19-21]自 1980 年 Gordon 等人^[19]揭示了在电解质溶液中银/电解质溶液界面上的 SP 共振与电极电位呈函数关系,并讨论了影响共振位移的影响因素以来,SPR 技术在界面电化学领域的研究得到了较大的发展。尤其是最近十年,很多研究组对 EC-SPR 技术应用更为深入。

董绍俊院士的研究组以 SPR 传感片上的金膜作为电化学测定的膜电极,将 SPR 技术与循环伏安、电化学阻抗联用,从不同的角度分析发生在电极表面的及其附近的化学和物理过程,在表征表面的氧化还原过程、单层及双层膜的形成、物质沉积和吸附、离子的检测等表面过程方面进行了大量工作^[22-24],并分别对聚苯胺的电化学聚合行为、聚苯胺膜在电化学氧化还原过程中膜的溶胀/收缩行为以及阴离子的掺杂/去掺杂行为原位地进行了详细的考察^[24, 25]。此后,他们又通过还原溶解氧,以原位电生成媒介物 H_2O_2 作为氧化剂,在金电极表面阴极合成的聚苯胺膜,并且利用 SPR 检测多晶金电极和金电极基底上聚苯胺膜的平均增长速率。结果显示此种方法制得的膜厚易于控制在分子水平,有潜力应用到纳米元件领域^[26]。该课题组还利用 EC-SPR 探索了金电极表面上导电聚合物聚吡咯膜的电化学合成^[104]。

最近,他们将 EC-SPR 技术应用在生物分子领域^[27]。王建龙等应用 EC-SPR 技术,通过在金膜上催化沉积金属离子检测小生物分子。由于抗坏血酸的浓度可以影响在金膜上银的沉积量,从而导致不同程度的 SPR 信号增强,并且沉积在金膜上的银可以通过溶出实现 SPR 传感表面再生,因此,为电化学方法检测抗坏血酸浓度提供了可行性^[28]。在 DNA 方面,研究了复合物膜(带负电的小牛胸腺双链 DNA 和带正电的 Zr^{4+} 离子交替多层组装膜)和血红蛋白细胞色素 C 间的相互作用^[29],考察了电场激发多层膜(层层组装 DNA 和 Zr^{4+} 的膜)的分解。通过控制施加电位来控制膜分解速率,从而实现可控的释放 DNA,并能够保证连续电化学释放出的 DNA 仍然具有完整性和基因转染活性^[27]。

Iwasaki 等利用 EC-SPR 技术表征了膜电极表面发生的表面反应^[30-32]。磷酸盐电介质溶液中的探针离子 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 在金电极表面的氧化还原过程可以通过循环伏安和 SPR 进行表征^[31],由于探针离子的氧化还原导致分子的电子结构的变化,在电子传输过程中导致金电极表面的介电常数的变化,因此引起 SPR 信

号的改变, SPR 信号对时间的导数与电流变化相关。在使用低浓度的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 时, 在电极表面吸附的磷酸盐离子被探针离子替代的过程可以从 SPR 图谱上观察到。在使用高浓度的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 时, SPR 信号的变化反映的是 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 的氧化还原态的不同导致的折射率的变化。在持续的进行电压扫描的情况下, SPR 信号相对于电压的变化的图谱完全改变了, 而循环伏安曲线没有变化, SPR 信号表明电极表面形成了一层膜, 但是电化学数据显示这层膜并不影响电子的传输反应。另外, Iwasaki 等将辣根过氧化物酶(HRP)-钌 (Os) -聚乙烯吡啶修饰电极用于固定葡萄糖氧化酶, 采用电化学/SPR 技术研究了 HRP 对葡萄糖氧化酶电活性的影响, 并将此电极用于葡萄糖的检测^[32]。

Baba 等建立电化学方法与原位表面等离子体共振 (surface plasmon resonance spectroscopy, SPRS) 和表面等离子体场增强光散射 (surface plasmon field-enhanced light scattering, SPFELS) 的联用技术。由于基底施加循环的电位会导致基底上发生苯胺的电聚合, 随着聚苯胺膜的形貌变化膜的介电常数和膜厚发生变化, 产生明显的电子震荡, 因此可利用 SPRS 和 SPFELS 检测苯胺的电聚合过程和随后形成聚苯胺膜的掺杂去掺杂过程, 同时由循环伏安法获得苯胺的电聚合信息, 实现金电极上聚苯胺膜的光学和电化学性质的同时获得^[105]。此后, Baba 等利用 EC-SPRS/SPFELS 技术同时检测了层层自组装导电超薄聚合物膜的光学和电化学性质。以聚苯胺和磺化聚苯胺分别为导电层层自组装膜的聚阳离子和聚阴离子。由 EC-SPRS/SPFELS 监测在不同聚苯胺/磺化聚苯胺膜厚情况下掺杂/去掺杂过程, 获得了聚苯胺/磺化聚苯胺层层自组装薄膜不同膜厚对应的介电常数和同时发生的形貌变化的原位信息^[33]。2003 年, Baba 等又利用 EC-SPR 研究了苯胺或聚(3, 4-乙烯基二羟基噻吩 PEDOT) 的聚合作用中阴离子掺杂/去掺杂过程, 膜沉积作用和电致变色性质, 精确地确定了不同掺杂程度下导电聚合物超薄膜的复杂的介电常数和光学传导率^[17]。还比较了在裸金电极上和表面修饰十八烷基硫醇 (octadecanethiol, ODT) SAM 的金电极上电聚合生成聚吡咯的过程, 说明了裸金电极上吡咯电聚合过程需要金电极和吡咯单体间的电子转移来实现, 而 ODT SAM 修饰的金电极中, 由于 ODT SAM 是一层绝缘层, 吡咯的电聚合受到阻碍^[21]。

此外, 在电聚合方面, Gu 等应用 EC-SPR 波谱研究金膜上的聚(4-硝基-1, 2-苯二胺)的电聚合过程及其氧化还原态的变迁^[34]。Wang 等也应用了此联用技术检测膜掺杂和去掺杂时电聚合和离子捕获过程中, 聚合物膜厚变化引起的反射率改变^[35]。Taranekekar 等应用 EC-SPR 研究了共聚作用电化学光学性质^[36]。

在酶化学方面, Schlereth 等应用 EC-SPR 研究了表面固定的酶的电化学催化行为^[37]。Raitman, O. A. 等^[43]和 Tian, S. 等^[38]应用在沉积聚合物的电聚合过程或阴

离子掺杂/除杂过程中对电致变色性质的膨胀和收缩行为的原位检测技术,整合氧化还原酶和导电聚合物作为生物电催化膜,拓展了生物传感器的种类。

Simonian 等研制了一种纳米复合材料薄膜的静电组装方法。采用 EC-SPR 实时检测传感元件的组装并原位的电化学检验酶加入到多层膜(由金属有机电子交换聚合物(RP)和氧化还原酶、葡萄糖氧化酶(GOX)、乳酸氧化酶(LOX)和丙酮酸氧化酶(PYX)交替铺层制得)纳米结构上时基底电流的变化,说明了酶的活性和在氧化还原聚合物和酶之间的电子迁移^[39]。Tang 等基于酶生物催化沉淀物放大抗体-抗原相互作用,制备了抗体-抗原-碱性磷酸酶(AP)标记的二级抗体三明治结构,将酶生物催化产品沉积在免疫传感器电极表面,用 SPR 放大信号检测共振角位移和 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 氧化还原电对的法拉第电子阻抗。这一方法可用于其他三明治免疫分析并可检测其他低浓度抗体抗原相互作用免疫分析^[40]。

在生物电化学方面,电化学/SPR 技术能够监测生物分子在电极表面的吸附行为,可利用其研究生物分子的电化学氧化/还原过程^[41-43,103]。schlereth 等^[41]将 SPR 与电化学循环伏安法联用研究了细胞色素 C、细胞色素 C 氧化酶在烷基硫醇修饰金电极表面的吸附过程,并对两种蛋白质在修饰电极表面的覆盖度和电化学氧化/还原过程进行了探讨。长春应化所杨秀荣^[42]等在巯基丙酸单分子层修饰金电极表面固定铁蛋白,利用 SPR 和循环伏安法对电极的组装过程和铁蛋白的直接电化学氧化/还原进行了研究。Raitlman 等^[43]将聚苯胺/聚丙烯酸膜修饰电极用于葡萄糖氧化酶和乳酸脱氢酶的固定。电化学/SPR 研究结果表明:聚合膜氧化态(PAn^{2+})和还原态(PAn)之间的可逆转换对葡萄糖氧化酶、乳酸脱氢酶的电化学氧化/还原过程有一定的促进作用;此修饰电极用于葡萄糖和乳酸的检测具有很好的响应特性。此外 Boussaad 等人^[103]也证实 SPR 光谱技术能够用于氧化还原蛋白质在电极表面的构象变化及其氧化还原电子传递过程的研究。Liu 等^[44]在缩氨酸修饰电极表面固定生物素标记的互补 DNA 链,再吸附二茂铁-亲和素复合物。采用电化学/SPR 检测了 DNA 杂交时放大的 SPR 响应和基于二茂铁增强的电化学响应信号。

而纳米材料方面,Ling 等用 EC-SPR 检测 ferrocenyl dendrimers and β -CD-功能金纳米粒子在分析印制板上原位吸附和脱附现象。通过在纳米粒子膜的特殊领域应用电化学氧化物,可以检测局部纳米粒子的脱附。非氧化区域,纳米粒子保持很强的表面吸附能力,而在电化学氧化区域,纳米粒子完全消失^[45]。Hiep 等应用 EC-SPR 研究核-壳结构纳米粒子。即,制备了一种新型金膜基底(核-壳结构纳米粒子)来传感信号 SPR 检测二氧化硅纳米粒子的核大小和沉积的金壳厚度。结果显示保持核大小为常数,当壳厚度增加,SPR 波谱的峰波长移向短波,并且在某一特定的壳厚度处出现最大峰强度。应用这种结构,我们用膜基底纳米

传感器光学检测混合双分子层与蜂毒肽的键合,并用电化学技术确定溶液浓度对膜的干扰。拓宽了一个领域:通过在微流体上结合芯片和采用多列形式,实现功能上检测类似蛋白质毒素和其他膜靶多肽^[46]。

然而,在上述的 SPR 与电化学联用的实验中,人们都不可避免地遇到了一个问题:施加在 SPR 基底上的电位改变了基底电子密度并造成 SPR 共振角位移^[75]。这个固有干扰在极小厚度变化时将成为一个突出的问题。尽管有人认为氧化还原反应可以通过引入电活性物质诱导,但溶液成分(折射率)的剧烈变化也会导致 SPR 共振角位移。为此, Xiang 等引入 SECM 的表面电化学活性测量功能,利用 SECM 探针产生的氧化还原物种来诱导 SPR 基底上电活性物质(细胞色素 c (cyt c) 分子)的氧化还原,从而避免了对基底施加电位而引起的 SPR 角度偏移,并由 SPR 检测表面固定细胞色素 c (cyt c) 分子的构象变化引起的膜厚变化^[12]。

此前, Szunerits 等也曾将这两种表面分析技术 (SECM、SPR) 联用,探索 SECM-SPRi 技术在固/液界面电聚合方面的应用,同时提出了该技术还可应用于检测基底上伴随着氧化态变化的反应及其动力学研究^[7]。随后,他们又将该联用技术应用于固液界面上 DNA 杂交过程的研究^[47]。

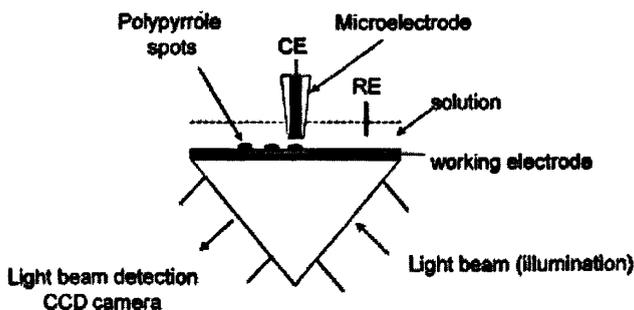


图 1-1 SECM-SPRi 的装置图^[7], 图中, CE-对电极, RE-参比电极

Fig.1-1 SECM-SPRi system^[7], CE counter electrode, RE reference electrode

不同的是, Szunerits 等建立的联用技术,仍以 SPR 基底为工作电极, SECM 探针为对电极,从而既保证了 SPR 对基底上沉积的电聚合物厚度进行检测,又保证了导电聚合物在微区内沉积。

SECM-SPR 联用技术作为生物传感和表面分析领域里的一种新型界面分析技术,因其兼有 SECM 的高分辨率和 SPR 的高灵敏度的优势而具有很强的生命力,同时,其拓展的“读写并行”理念将为发展新型界面分析技术提供更为人性化的思维空间。不过,作为刚刚起步的新型联用技术,SECM-SPR 系统有其不足之处需要不断完善,如空间分辨能力和灵敏度仍待提高。

1.1.2 联用技术的工作原理

SECM-SPR 联用技术利用 SECM 的微米级空间分辨率、表面电化学活性测量等功能和 SPR 的亚埃米级厚度检测限的优点，同时弥补 SECM 灵敏度低，并且不能获得表面吸附的分子构型变化信息，以及 EC-SPR 的金属基底电场变化对等离子体激元密度影响等方面的不足，将溶液中微区选择性诱导和表面高灵敏检测相结合，从而实现高选择、原位、动态的现场研究。联用技术的工作原理可以从以下两个方面介绍：

1) SECM 基本原理

SECM 装置如图 1-2 所示，主要由电化学部分（电解池、探头、基底、参比电极、辅助电极和双恒电位仪）和用来精确控制、操作探头和基底位置的压电驱动器，以及用来控制操作、获取和分析数据的计算机三部分组成。微电极探头固定在可三维调节的微控制器上，可以精确控制其在基底电极上的位置。基底固定在电解池的底部，可以是各种材料的导体电极，也可以是生物物质或细胞等绝缘基底。双恒电位仪用来控制探头和基底的电位。

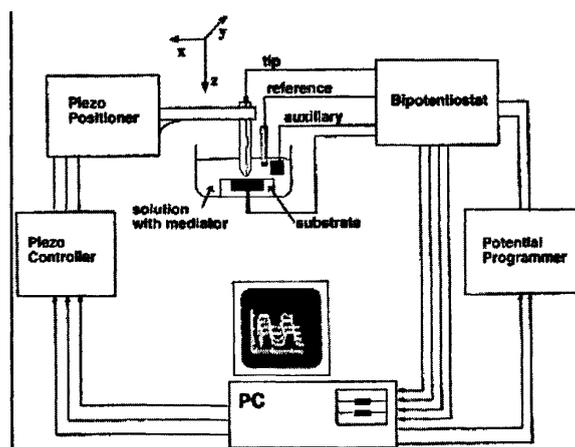


图 1-2 SECM 装置图^[48]

Fig.1-2 Block diagram of the SECM apparatus^[48]

SECM 与其它电化学技术相比具有以下两个优点：（1）能够用于反应机理的研究和探测界面现象。（2）分辨率高（在亚微米和纳米级范围内）和传质速度快，由此可以在稳态条件下研究快速反应过程。它已被应用于许多领域，既可以作为电化学技术，也可以作为描绘图像的仪器和作为微加工的工具。这些功能均通过不同的工作模式来完成（见图 1-3）。

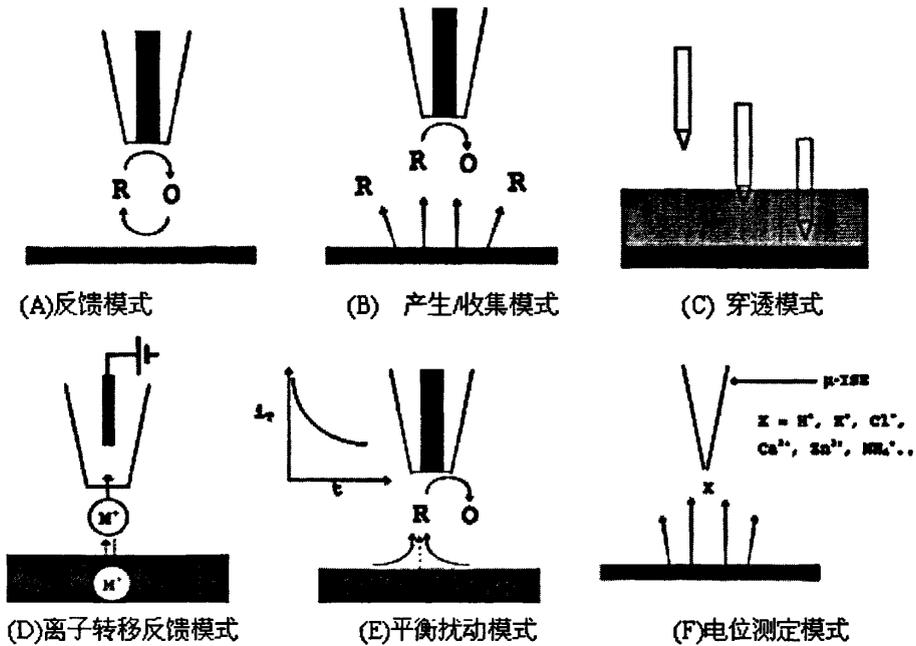


图 1-3 SECM 六种常用工作模式示意图

Fig.1-3 Six operating modes of SECM

其中，我们主要采用了 SECM 的电流反馈模式（图 1-3A 和图 1-4），它是 SECM 应用最广泛的主要进行定量分析的工作模式。

在反馈模式（如图 1-4）下，微电极作为扫描电化学显微镜的探头，电荷在探头和对电极之间流动，研究的样品作为基底，溶液中含有氧化还原电对。

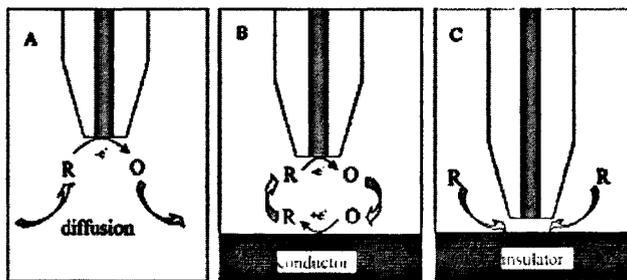


图 1-4 SECM 的反馈模式示意图，(A) 探针远离基底，O 向电极的扩散形成稳态电流 $i_{t,ss}$ ，电极反应为 $O + ne^- \rightarrow R$ ；(B) 探针接近导体基底，O 在基底重新生成，发生正反馈，使 $i_t > i_{t,ss}$ （正反馈）；(C) 探针接近绝缘基底，O 向电极的扩散受到阻碍，使 $i_t < i_{t,ss}$ （负反馈）^[48]

Fig.1-4 Feedback mode of the SECM operation, (A) The UME tip is far from the substrate; (B) Positive feedback: species R is regenerated at the substrate; (C) Negative feedback: diffusion of R to the tip is hindered by the substrate^[48]

以氧化介质(O)为例,当探头上施加足够负的电位时,O在探头上发生还原反应:



此时,电极反应的速率受O向探头扩散的速度控制(如图1-4A)。当探头离基底很远时,探头上的稳态扩散电流 $i_{T,\infty}$ 可由下式计算:

$$i_{T,\infty} = 4nFD_0C_0\alpha \quad \text{公式 (1-1)}$$

式中 n 是电子转移数, F 是法拉第常数, D_0 是O的扩散系数, C_0 是O的浓度, α 是探头的半径。公式(1-1)是针对超微圆盘电极推导而来,对于其它形状的电极同样适用。

当探头不断靠近基底时,探头上的电流 i_T 将随基底性质的不同而发生相应的改变,若基底是导体,即探头上的还原产物R在基底上被氧化为O,O扩散回探头,使反应(1-1)继续发生,从而使探头电流增大,即 $i_T > i_{T,\infty}$,这种现象称为“正反馈”(图1-4B);反之,将探针移至绝缘基底上方,即扩散到基底的还原剂R与基底不发生氧化还原作用,无法重新获得O而使O向探针表面的扩散无法得到及时补充,O不断消耗, i_T 将随探头靠近基底而减小,即 $i_T < i_{T,\infty}$,这种现象称为“负反馈”(图1-4C)。还原性物质R在基底上被还原的速率决定了探头电流变化的程度,通过这种变化,可以研究相关反应的动力学过程。当探头在基底上方扫描时,探头的电流随基底的起伏和性质的变化而发生相应的变化,对于导体基底, d 很小时,探头和基底间的传质速度很快,因此可以用此模式来研究探头与基底电极上的快速异相电子转移反应。

在该模式下,探针与基底之间大概的距离可由反馈模式中的电流响应得出。有如下近似方程:

$$i_T(L)/i_{T,\infty} = 0.68 + 0.78377/L + 0.3315 \exp(-1.0672/L) \quad \text{公式 (1-2)}$$

$$i_{T(L)}/i_{T,\infty} = 1/[0.292 + 1.5151/L + 0.6553 \exp(-2.4035/L)] \quad \text{公式 (1-3)}$$

其中, L 为归一化探针-基底距离($L=d/a$), a 为探针半径。近似方程(1-2)和(1-3)的理论曲线如图1-5所示:

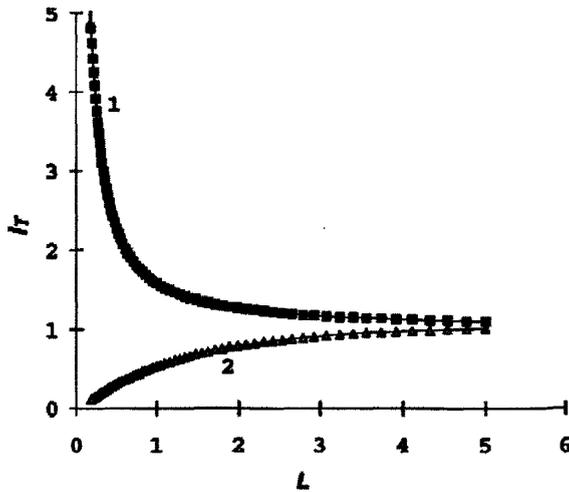


图 1-5 SECM 探针接近不同基底时的电流-距离理论曲线, (1)探针接近一个导体基底; (2) 探针接近一个绝缘基底^[48]

Fig.1-5 Theoretical approach curves for a tip electrode over a conductive (1) and insulating (2) substrate^[48]

2) SPR 基本原理

SPR 是发生在金属薄膜与电介质分界面上的一种物理光学现象^[49]。

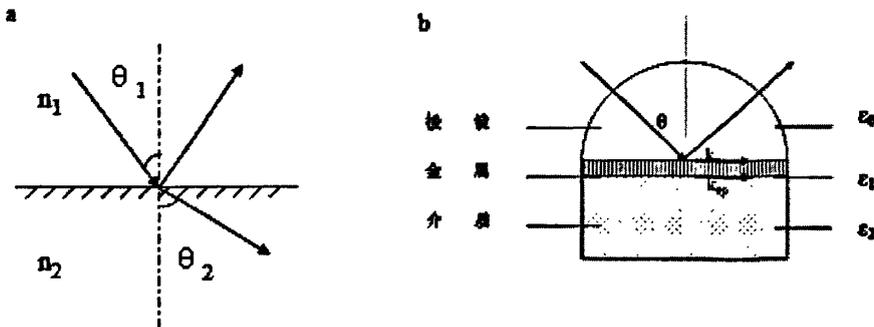


图 1-6 SPR 原理图

Fig.1-6 Principle of SPR

当光源发出的 P-偏振光以一定的角度入射到棱镜中, 在棱镜和金属界面处将发生反射和折射 (如图 1-6a)。光波从光密介质 (折射率为 n_1) 射向光疏介质

($n_2, n_1 > n_2$) 时, 根据折射定律, $\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \frac{n_2}{n_1}$, 若入射角 θ_1 大于临界角 θ_c

($\theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1}$)，即 $\sin \theta_1 > \sin \theta_c = \frac{n_2}{n_1}$ ，会有 $\sin \theta_2 > 1$ ，此时没有折射光，光线全部返回棱镜中，发生了全反射（如图 1-6b）。

在全反射情况下，电场在金属和棱镜的界面处并不立即消失，而是以消逝波的形式沿垂直于界面方向向金属中呈指数衰减。消逝波沿 X 轴向（与界面平行）传播的波矢量分量 k_x 为：

$$k_x = (n_0 \omega / c) \sin \theta \quad \text{公式 (1-4)}$$

式中， n_0 为棱镜的折射率， ω 为入射光波在真空中的角频率， θ 为入射角， c 为入射光在真空中的速度。

同时，消逝波与金属薄膜中的自由电子相互作用，激发出沿金属导体表面传播的表面等离子体波（Surface Plasmon Wave, SPW）——一种在金属表面振荡的电磁波，其沿 X 轴方向与表面平行的固有波矢为 k_{sp} ：

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_M \epsilon_a}{\epsilon_M + \epsilon_a} \right)^{1/2} \quad \text{公式 (1-5)}$$

式中， ω 为入射光波在真空中的角频率， c 为入射光在真空中的速度， ϵ_M 、 ϵ_a 分别为金属和介质的介电常数。

频率为由消逝波引发的 SPW 的频率与消逝波的频率相同，当入射光的角度或者波长发生适当的改变，消逝波在 X 轴的波矢分量 k_x 与 SPW 沿 X 轴方向的固有传播波矢 k_{sp} 满足：

$$k_x = k_{sp} \quad \text{公式 (1-6)}$$

消逝波与 SPW 发生共振，入射光的大部分能量被 SPW 吸收，使得反射光能量急剧下降，从而出现共振吸收峰。由于发生了入射光的能量吸收，这种全反射形式也被称为衰减全反射（Attenuated Total Reflection, ATR）。由公式 1-4 可知，SPW 的 k_{sp} 与金属折射率及光疏媒质折射率有关。理论计算表明^[50]，当光疏媒质折射率发生极细微的变化时，将会相应的改变共振吸收峰的位置。SPR 传感技术就是利用上述原理对金属表面的被分析物进行检测的。

SPR 具有两个基本模型（见图 1-7）——Otto 模型和 Kretschmann 模型，而本实验采用 Kretschmann 模型。在 Kretschmann 模型（图 1-7b）中，将几十纳米

厚的金属膜直接覆盖在棱镜底部，待测物质在金属膜下面，消逝波透过金属薄膜，在金属/介质界面处发生表面等离子共振现象。在这种模型中，由于消逝波必须透过金属膜才能产生 SPR 现象，因此金属膜的厚度对测定结果会有很大的影响。若厚度超过消逝波的有效深度，则消逝波在金属膜内会有很大衰减，无法达到金属/介质界面。若金属膜过薄，则不能达到最佳共振效果。

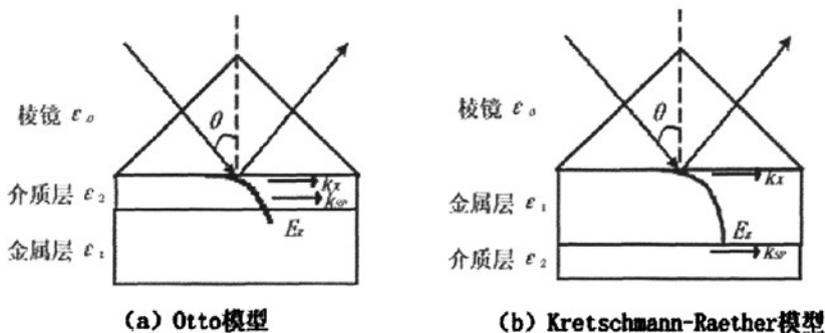


图 1-7 两种 SPR 模型示意图

Fig.1-7 SPR model schemes

实验前还需调节检测器的位置，使反射光吸收最大的部分（即“黑线”）落在单元 A 和 B 的中间，此时(A-B)的信号值为零，检测器对黑线的位移极为敏感。当金属膜的厚度或折射率发生了变化，SPR 共振角偏移，黑线将离开平衡位置，相应地，(A-B)/(A+B)的信号值随时间的变化被记录下来，生成 SPR 图，如图 1-8 所示。

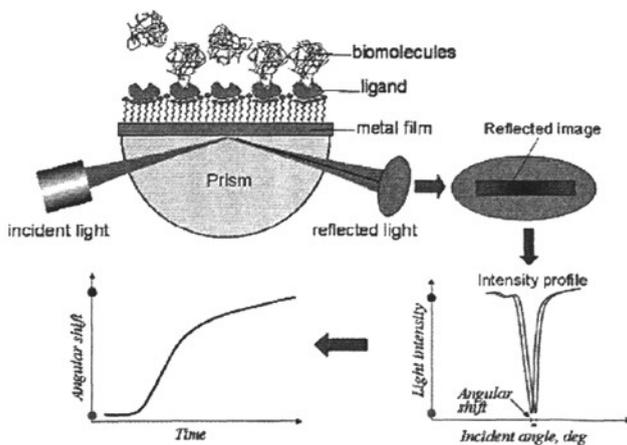


图 1-8 “黑线”的产生与 SPR 感应图

Fig.1-8 SPR influence chart

3) 联用技术的基本原理

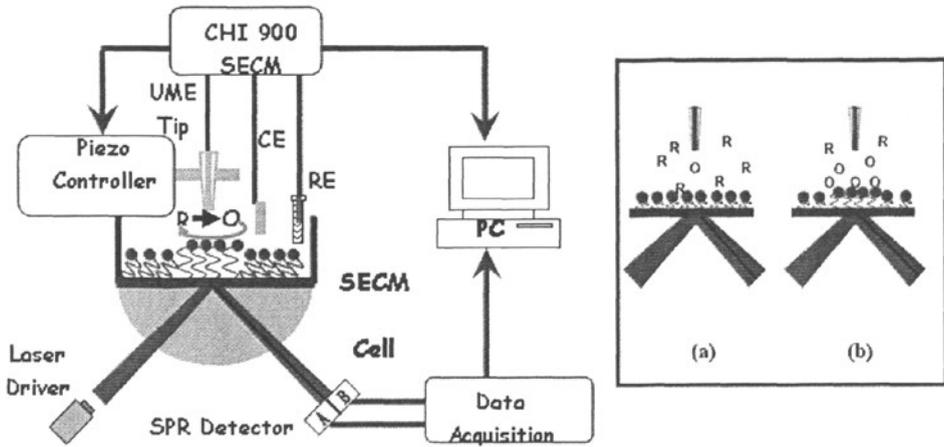


图 1-9 SECM-SPR 联用技术研究 MT 金属结合的实验装置示意图^[12], SECM (Model CHI 900) 通过控制压电控制器来移动探针, 自制的 SPR 仪器用于收集 SPR 信号, SPR 信号通过由 Labview 程序控制的数据收集装置记录, SECM 和 SPR 仪器可由同一台计算机控制, 探针生成氧化剂 (O) 对膜上具有氧化还原性质部分进行氧化作用, 从而产生膜的局部厚度变化, 插图: (a) 探针上生成了氧化剂 O; (b) 氧化剂 O 以扩散控制速率生成时扩散带图示, 值得注意的是被激光光斑照射到的区域比探针的尺寸大很多, 并且在分子取向改变的同时, SPR 共振角的位置 (黑线处) 已经从 (a) 变化到 (b)

Fig.1-9 SECM-SPR combination for studies of interaction between MT and metallic ion^[12], SECM (Model CHI 900) tip is controlled by piezo controller, SPR signal is collected by home-made SPR apparatus, inset: schematic representations of the diffusion zones at the moment when O is generated at the tip (a) and at the time when O is produced at the diffusion-controlled rate (b), notice that the area illuminated by the laser spot is much greater than the tip size and the position of the SPR dip (dark line) has changed from (a) to (b) upon the molecular orientation change

以图 1-9 SECM-SPR 联用技术的实验装置图所示为例, SECM 探针和电解池直接放置在 SPR 基底上方^[12]。我们应用 SECM 的电流反馈模式, 采用三电极体系, 其中, 金超微电极探针 (UME Tip, 半径为 α) 作为工作电极, Ag/AgCl 和铂丝分别作为参比电极和对电极。实验中, 利用 SECM 的反馈模式将探针和基底间距逼近为 d , 在电解池中注入含电化学活性物种 R (还原态物质, 可被氧化) 的溶液, 使探针电极和基底均处于溶液之中。当探针上所加电位足够正以使 R

氧化为 O，再利用探针生成的氧化态物种 O 与基底物质 A 发生作用，即采用间接诱导方式使基底物质产生构象变化 A'，从而引起局部膜厚变化，SPR 共振角位移发生改变。SECM 探针与 SPR 基底上发生反应如下：



反应(1-3)中，A 为组装在 SPR 基底上的物质，A' 为 A 的氧化产物。

1.2 金属硫蛋白

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)广泛存在于人和动物的实质性脏器中。由于 MT 与金属离子有很强大的螯合力，它具有重要的生物学功能，主要涉及：(1) 体内必需金属元素的储运、代谢和精细调节，使机体达到最佳生理状态；(2) 通过与重金属离子配位结合成无毒或低毒络合物，从而消除汞、铅、镉、砷等重金属的体内毒害作用；(3) MT 能通过巯基和自由基结合来清除体内的自由基，并对自由基损伤有修复作用，抗生物氧化，防止机体衰老，并因其抗 X 射线及 UV 能力大于一般细胞而具有减轻电离辐射对细胞的损伤的作用；(4) 调控金属酶或转录因子的活性，抗应激反应，增强机体对各种不良状态的适应能力；(5) 参与调控细胞分化和信号传导；(6) 调控细胞代谢，防止细胞癌变。可见，研究 MT 的金属结合有着重要的现实意义。

1.2.1 金属硫蛋白的定义和结构

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 是细胞内一类富含巯基、性质独特、可诱导的低分子量非酶金属蛋白质或多肽，MTs 的化学名为金属硫组氨酸三甲基内盐，它具有以下特征^[53]：

- a) 低分子量，大多数约为 6000-7000 道尔顿，含有 60-63 个氨基酸残基，脱去金属后即为硫蛋白 (thionein, apo-MT)，相对分子质量 6000 Da；
- b) 特征氨基酸组成 (含有高达 23-33% 的半胱氨酸残基、没有二硫键、不含芳香族氨基酸和组氨酸)；
- c) 独特的氨基酸序列结构 (半胱氨酸残基在氨基酸一级序列中的分布极为保守性，分布有特征性，如：Cys-X-Cys，其中 X 代表除半胱氨酸外的其它一个或多个氨基酸)；

以图 1-10 兔肝 MT-2 的一级结构为例：

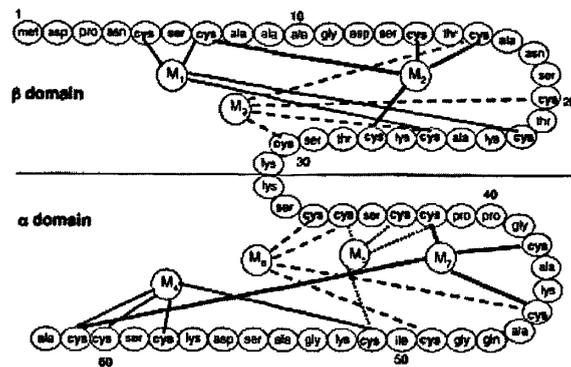


图 1-10 兔肝 MT-2a 的氨基酸序列^[51]

Fig.1-10 Primary amino acid sequence of rabbit liver MT-2a^[51]

- d) 金属硫醇盐的光谱特征，所有半胱氨酸残基均以还原态存在，通过硫键与金属离子结合，因此具有金属巯基化合物的光谱学特性，如 Zn-MT 的最大吸收值在 220 nm，Cd-MT 在 250 nm，而 Cu-MT 则在 270 nm；
- e) 金属硫醇盐簇结构，每个 MT 可结合 7 个二价金属离子，如 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} ，或 11-18 个一价金属离子，如 Cu^+ 、 Ag^+ 。

根据结构和来源的不同，金属硫蛋白可以被分为以下三类^[52]：

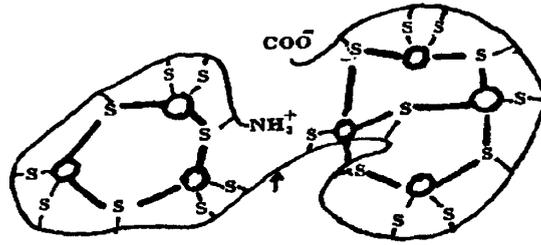
第 I 类：所有脊椎动物的金属硫蛋白和具有明显相关结构的其它门类动物的金属硫蛋白；

第 II 类：一级序列与哺乳动物金属硫蛋白无关或关系很远的金属硫蛋白类型，如海胆，玉米，酵母和一些原核生物（藻类）中的金属硫蛋白；

第 III 类：植物中的金属硫蛋白，实际是一些典型的含有 γ -谷胱甘肽单位的多肽，是较短的非转录合成的金属硫肽。

所有第 I 类和第 II 类 MT 均为单链，哺乳动物 MT 含有 61-62 个氨基酸残基，一些非哺乳动物和真菌中的 MT 的肽链则很短，如粗糙链霉菌 MT 中仅有 25 个氨基酸残基；第 III 类 MT 通常是由不同长度的两条或更多的肽链组成的寡聚体结构。

哺乳类 MT 包含 61-62 个氨基酸残基，20 个半胱氨酸^[53]。在无脊椎动物和真菌中发现更短的肽链，如 Prinz 和 Weser 发现酿酒酵母 X-2180-1Aa 菌株中的 Cu-MT 含 53 个残基，12 个半胱氨酸^[106]。最短的多肽链存在于粗糙链霉菌 MT 中，该 MT 含 25 个残基，7 个半胱氨酸。而某些高等植物 MT 是由两条或更多条长度不等的多肽链构成的低聚物。

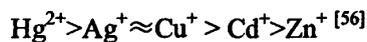
图 1-11 MT 的三级结构^[53]Fig.1-11 The tertiary structure of MT-2a^[53]

经核磁共振、X 射线等技术研究发现, 虽然不同 MT 中氨基酸顺序不同, 但空间结构却相似, 即 MT 整个分子呈哑铃形, 由 α 和 β 两个大小相近的球形结构域组成, 即氨基端的 1~29 残基形成 β 结构域, 羧基端的 31~61 残基形成 α 结构域, 两个结构域通过第 30, 31 位的 Lys 残基(铰链区)相连, MT 铰链区的存在使 2 个结构域存在较大的柔性和可变性, 从而使 MT 中的金属离子与溶液中的金属离子易于交换, 除此之外, 两个结构域中的金属也可以进行交换, 为其调节体内金属离子的代谢提供了结构基础^[53]。

α 和 β 结构域具有不同的结合金属元素的能力^[54], C 端 α 结构域包含 11 个半胱氨酸(Cys)结合 4 个 Zn^{2+} 或 Cd^{2+} , 或结合 5-6 个 Cu^{+} , 形成 M_4S_{11} 形态, N 端 β 结构域包含 9 个 Cys 结合 3 个 Zn^{2+} 或 Cd^{2+} , 或结合 5-6 个 Cu^{+} , 形成 M_3S_9 形态, 即 20 个 Cys 可以结合 7 个 Zn^{2+} 或 Cd^{2+} , 或多达 12 个 Cu^{+} 。apo-MT 高级结构为无序的结构, 但它一旦结合金属离子后就会折叠成有序的结构。天然的 MT 分子不含二硫键, 也没有自由的巯基存在, 在每个区中 Zn 和 Cd 都是以二价状态和 4 个 Cys 的巯基结合, 形成 $[M^{2+} (Cys)_4]^{2-}$ 络合物而使得整个分子带负电, Cu 则是以一价的形式结合^[107-109]。

又如晶体结构分析表明, 在这两个结构域内, 为了更适于结合金属, 多肽链盘绕着金属离子而各形成三个回折(如图 1-12)。

金属与 MT 形成络合物的稳定常数在 $10^{13} \sim 10^{22}$ 之间, 不同的金属离子与 MT 的结合力有较大的差异, 结合最强的是 Hg, 按如下顺序递减:



在哺乳动物中, 一般一个 MT 分子最多能与 7 个二价金属离子如 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 等结合, 或能与 12 个一价金属离子如 Cu^{+} 、 Ag^{+} 或 Au^{+} 等结合。与巯基结合着的金属离子可位于 MT 分子中的终端, 也可在 MT 分子链中起桥连的作用^[56]。

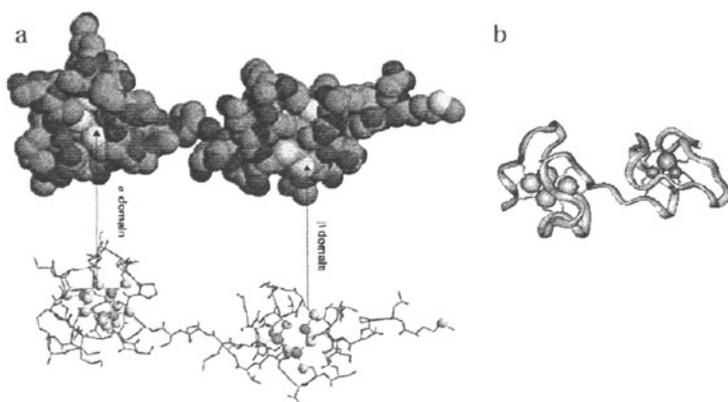


图 1-12 兔肝 MT-2a 的空间填充和球棍模型(a), 兔肝 MT-2a 的晶体结构 (b)^[55], a 图中深色球为 Zn(II)或 Cd(II), 浅色球为 S, 在 β 域有六个半胱氨酸残基通过三个交联键与三个二价金属配位, 在 α 域有六个半胱氨酸残基通过四个交联键结合四个二价金属

Fig.1-12 Space-filling and ball-stick representation of the rabbit MT-2a(a), crystal structure of rabbit liver MT-2a(b)^[55], (a) Atom legend: dark=Zn²⁺ or Cd²⁺, gray=S, in β domain there are 3 M²⁺ binded by 6 cysteines, while in α domain there are 4 M²⁺ with 6 cysteines

一般在 MT 分子中会形成两个结构域即 α -结构域和 β -结构域, 如图 1-12 所示, 这两个结构域使 MT 分子形成两个结构不同的金属-蛋白质族, 在这两个族中巯基与金属结合的亲和力有所不同, 其中 α -结构域包含的一个族包括从 MT 分子的第 1 个到第 30 个氨基酸, 结合有 4 个两价的金属离子, 通常结合力顺序为: Cd > Zn > Cu; 而含有分子中第 32 至 61 个氨基酸的 β -结构域结合有 3 个二价金属离子, 其结合力顺序却是: Cu > Zn > Cd. α -结构域常处于肽链的 C 端, 而 β -结构域处于氮端。因此处于碳端的 α -结构域包含有 11 个半胱氨酸基而形成 M²⁺₄-S₁₁, 在 N 端的 β -结构域含有 9 个半胱氨酸基并形成 M²⁺₃-S₉^[68]。

1.2.2 金属硫蛋白与金属结合的性质

对 MT 与金属结合规律的研究, 除对其结构进行研究外, 与金属结合的性质研究也是非常重要的一个方面。

哺乳动物 MT 的等电点在 pH=3.9~4.6 之间, 在生理条件下 (pH 7.0~7.4), 金属硫蛋白带负电荷。研究还表明, 不同种属的 MT, 其等电点可能有些差异。例如, 马肾 MT 在 pH7.5~9.5 之间, 带 2 个负电荷; 而人、鼠、兔的 MT-2, 在 pH8.6 下, 带有 3 个负电荷。MT 在天然状态下, 所有的 Scys 均与金属离子结合, 不存在游离的 Scys, MT 与金属离子结合的稳定常数一般较大。因此, apo-MT 必须在较低的 pH 值条件下才能获得。对于 MT 与金属结合的性质研究, 主要集中在稳定性方面进行研究, 这包括热力学性质和动力学性质。

1) MT 与金属结合的热力学性质

MT 可以同多种金属离子在体内或体外结合^[57], 结合的稳定常数可通过用 pH 滴定的实验结果求出解离常数。用这种方法所计算出的兔 Cd₇-MT 和 Zn₇-MT 的解离常数分别为 10^{-22} 和 10^{-18} , 由此可以获得其平均解离常数。实验证实, K_{Ca} 与 K_{Zn} 分别为 5×10^{-17} 和 5×10^{-13} 。采用同样的方法计算, 人的 K_{Zn} 为 1.4×10^{-13} 。根据其热力学的稳定性, 可计算 MT 与许多金属离子结合的稳定常数。研究证明, 许多重金属可以诱导 MT 进行生物合成。由体内分离纯化得到的 MT 通常含有 Cu、Zn、Hg、Cd 等金属元素。而在体外实验中, 许多金属离子包括 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ag^+ 、 Cu^+ 、 Au^+ 、 Bi^{3+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Pt^{2+} 和 Tc^{4+} 等都可以与 MT 结合。根据其稳定常数可以知道, MT 对金属离子亲和力的大小顺序与典型的硫醇盐对金属离子的亲合顺序相一致。即 $Fe^{2+} < Co^{2+} < Zn^{2+} < Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^+$, Ag^+ , $Bi^{3+} < Hg^{2+}$ ^[57]。

2) MT 与金属结合的动力学性质

从 MT 与金属离子的热力学研究知道, MT 与金属结合的稳定常数较大。但实验证实, MT 在体内、外还具有很高的动力学活性。在体外, MT 中的金属离子很容易与溶液中的金属离子发生交换反应, 例如, 在 MT 之间, 不同 MT 中的金属离子可发生离子之间的交换, 其原因可能与 MT 所结合的金属离子本身固有的动力学性质有关, 也可能与 MT 本身结构及结构的柔性有关。MT 的 2 个结构域之间是通过 2 个铰链区联结的, 因此, 2 个结构域具有较大的柔性和可变性, 从而使金属暴露的机会增加, 这样使 MT 中的金属离子与溶液中的金属离子易于产生交换。核磁共振实验还证实, 金属巯基配位簇的配位键不断进行断裂和重组。放射性同位素研究则证明, MT 的 2 个结构域之间交换反应的速率存在着较大的差异, 由此可以获得这 2 个结构域在动力学性质上存在明显的差别。根据核磁共振实验得, MT 与金属离子的动力学稳定性, 与热力学稳定性的顺序相反。

综上所述, MT 与金属结合的稳定性的不仅取决于热力学性质, 而且还受其动力学的影响。

1.3 论文工作的背景与意义

揭示蛋白质的结构与功能的关系具有深远的生物学意义。实时探测化学和生物激励诱导的蛋白质结构变化对研究他们的结构和性质意义重大。很多光谱检测技术已经应用于检测活体内外的蛋白质构型变化, 如红外光谱法^[58, 59], 圆二色谱法^[58, 59], 核磁共振波谱法^[60, 61], X 射线单晶衍射法^[62]。然而, 这些方法中, 很多技术只在溶液或者固体状态下检测反应变化, 并且不能对固/液界面的蛋白质发生的快速的结构和动力学变化进行研究。同时, 这些方法都有某些固有的局限

性,如核磁共振波谱法的信号相对很小,红外光谱法只检测低浓度的蛋白质样品,X射线单晶衍射法对晶体的纯度要求很高。

为了实现对固/液界面上化学或生物激励诱导的蛋白质结构变化和动力学变化进行实时检测,我们引入了 SECM-SPR 联用技术。

首先,我们建立了 SECM-SPR 联用技术检测表面固定的蛋白质分子模型,即在预沉积了铜的 SECM 探针上施加正电位溶出铜离子,铜离子扩散到基底,与 SPR 基底表面固定的脱金属硫蛋白 (apo-MT) 结合,通过 SPR 实时检测这一过程中产生的构型变化和动力学信息。

然后,在 SPR 基底固定 Cu_{12} -MT,通过在 SECM 探针上施加氧化电位氧化溶液中的质子化试剂——对苯二酚释放质子,从而降低局部区域内溶液的 pH 值,即增加局部区域内溶液酸度,使 Cu_{12} -MT 释放出铜离子,发生构型变化,并由 SPR 检测。

最后,将以上研究模型应用于 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合的 SECM-SPR 检测,讨论二者的结合信息。

第二章 硫蛋白与 Cu^{2+} 的相互作用研究

2.1 引言

金属硫蛋白(Metallothionein, 简称 MT)是指一类低分子量, 高巯基含量, 能结合大量金属离子的蛋白质, 其化学名为金属硫组氨酸三甲基内盐, 具有独特的金属硫络合结构。它们在体内参与重要的微量金属的储存、运输和代谢, 并在重金属解毒、抗电离辐射和清除自由基过程中发挥重要作用, 因此对于它的结构功能以及作用机理的研究引起了人们强烈的兴趣。一些哺乳动物的 MT 结构已经由核磁共振^[63]和 X 射线晶体学^[110]检测出来, 它含有两个金属键区域。N 端 β 域含有 9 个半胱氨酸残基, C 端 α 域含有 11 个半胱氨酸残基, 所有的半胱氨酸都参与金属离子的捕获、转移和释放过程^[64-66]。

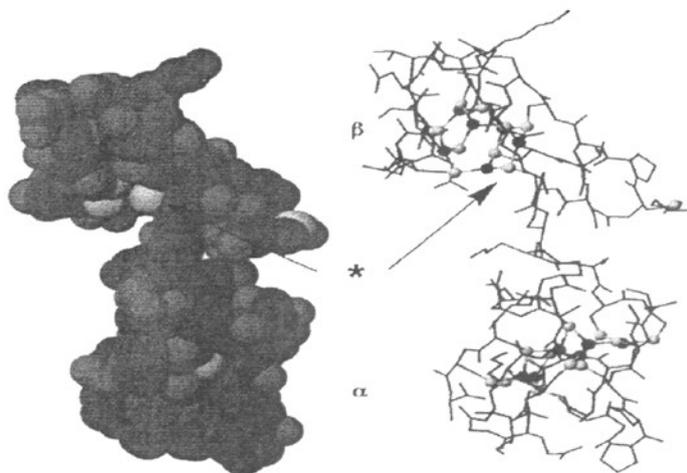


图 2-1 分子建模技术拟合出的 Cu_{12} -MT 结构图^[67], 球棍模型中, 灰球代表巯基, 黑球代表铜离子

Fig.2-1 Space-filling and tube representations of the proposed rabbit liver Cu_{12} -MT structure, key: black=Cu; gray=S, the asterisk denotes the accessible sites of the copper(i)-cysteine thiolate clusters^[67]

对于 Cu_{12} -MT, MT 的每个结构域中有 6 个 Cu^+ , 形成 $\text{Cu}_6(\text{Scys})_{11}$ α -结构簇和 $\text{Cu}_6(\text{Scys})_9$ β -结构簇, 12 个 Cu^+ 采取三角形结构与巯基配位, 且 Cu 优先结合到 β -结构域^[68]。 Cu_{12} -MT 的分子建模技术拟合模型见图 2-1^[67]。

金属硫蛋白对溶液的 pH 值具有敏感性, 不同的 pH 值会改变它在溶液中的

存在状态。MT 在酸性水溶液中存在如下平衡^[69]:



MT 与金属离子的结合是可逆的^[70, 71]。pH 值接近中性时, MT 主要以结合金属的形式存在, 降低溶液的 pH 值, MT 的金属即可脱去^[68]。不同 MT 的解离常数因其所结合的金属不同而异^[111], 各种 MTs 50%的金属离子发生解离的 pH 值分别是:

Zn-MTs 为 3.5~4.5、Cd-MTs 为 2.5~3.5、Cu-MTs 的 pH 值低于 1, 脱金属硫蛋白在低 pH 值时较稳定。

Stillman 等人对 apo-MT 与 Cu^{2+} 键合作用的活体外滴定分析和 Cu^{2+} 与含 Cd、Zn-MT 相互作用进行光谱研究, 通过不同的键合化学计量法说明了 Cu_{12} -MT 是稳定结构^[56, 68, 72]。同时, 在 Cu^{2+} 与 apo-MT 结合过程中, Cu^{2+} 到 Cu^+ 的还原过程伴随了部分 MT 的氧化作用 (MT 中一些半胱氨酸残基的氧化作用)^[73, 74]。在 Cu_{12} -MT 中, Cu^+ 离子均匀的分布在两个结构域, 形成了 Cu_6S_9 和 Cu_6S_{11} 的三角形结构。

在本章, 我们将采用 SECM-SPR 联用技术实时原位研究 apo-MT 与铜离子相互作用, 随后, 对于逆过程 (Cu-MT 的金属释放), 我们在 Cu_{12} -MT 基底上进行实验。我们发现联用技术不仅能控制金属键合的程度, 还可以定量研究 apo-MT 与铜离子的结合数和键合动力学。研究发现, apo-MT 捕获铜离子和 MT 释放铜离子过程都是分步进行的, 并存在三个稳定结构, 每种结构中铜离子的结合数目不同。由于 apo-MT 本身不具备电化学活性, 因此本研究将 SECM-SPR 联用技术的应用范围扩展到不具备氧化还原活性的蛋白质。

2.2 实验部分

2.2.1 实验试剂及材料

实验所用试剂及材料如表 2-1 所示:

表 2-1 实验试剂

Tab.2-1 The chemicals and materials

名称	分子式	分子量 ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	纯度	产地
硫酸	Sulfuric Acid	H_2SO_4	98.08	优级纯 焦作市化工三厂

30%过氧化氢	Hydrogen Peroxide	H_2O_2	34.01	分析纯	上海桃浦化工厂
盐酸羟胺	Hydroxylamine	HONH_2Cl	69.49	分析纯	湖南高纯化学试剂厂
	Hydrochlorid				
氯化钾	Potassium Chloride	KCl	74.55	分析纯	焦作市化工三厂
	Potassium				
铁氰化钾	Hexacyanoferrate (III)	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	329.25	分析纯	湖南, 湘中地质实验研究所
氯化钠	Sodium Chloride	NaCl	58.44	分析纯	焦碱集团化学试剂厂
硫酸钠	Sodium Sulfate	Na_2SO_4	142.04	分析纯	焦作市化工三厂
硫酸铜	Copper Sulfate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.68	分析纯	焦作市化工三厂
巯基十一羧酸	11-mercaptoundecanoic acid, MUA	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$	218.36	>98%	Aldrich(Milwaukee, WI)
N-(3-二甲氨基丙基)-N'-己基碳二亚胺盐酸	N-(3-Dimethylamino propyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$	191.70	>98%	Sigma-Aldrich 公司
N-羟基琥珀酰亚胺	N-Hydroxy-succinimide, NHS	$\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$	115.09	>98%	Sigma-Aldrich 公司
兔肝金属硫蛋白	Metallothioneins, MT	$\text{Zn}_7\text{-MT}$	6000-7000Da	≥90%	湖南麓谷生物技术有限公司
磷酸氢二钾	di-Potassium Hydrogen Phosphate	K_2HPO_4	174.2	≥98%	Sigma-Aldrich 公司
磷酸二氢钾	di-Hydrogen Phosphate	KH_2PO_4	136.09	≥99%	Sigma-Aldrich 公司
二氯甲基吡啶	Methyl viologen dichloride	MVCl_2	252.11	98%	Aldrich
L-甘氨酸	L-Glycine	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	75.07	>99.0%	北京鼎国生物技术有限责任公司
盐酸	Hydrochloric acid	HCl	36.46	36%, 优级纯	Alfa Aesar
浸镜油				折射率: 1.515	美国 Cargille Laboratories 公司

无水乙醇	Dehydrated Alcohol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	46.07	分析纯	湖南师范大学试剂厂
去离子水	Deionized Water	H_2O	18.02	18.2 M Ω	经纯水仪制得
氩气	Argon	Ar	39.95	99.99%	长沙
氮气	Hydronitrogen	N_2	28.01	99.00%	长沙
氢气	Hydrogen	H_2	2.02	99.99%	长沙

另外, 还需金靶, 纯度为 99.99%; 铬靶, 纯度为 99.99%。

2.2.2 实验仪器

实验所用仪器如表 2-2 所示:

表 2-2 实验仪器

Tab.2-2 Instruments

名称	型号	产地
定时恒温磁力搅拌器	JB-3	上海雷磁新泾仪器有限公司
超声波清洗器	KQ-50B	昆山市超声仪器有限公司
扫描电化学显微镜	CHI900b	上海辰华仪器有限公司
超微圆盘金探针	直径 10 μm	上海辰华仪器有限公司
饱和 Ag/AgCl 电极		上海辰华仪器有限公司
铂丝电极		上海辰华仪器有限公司
溅射镀膜机	108auto	CRESSINGTOM
全自动交流稳压电源	TND-C3000	北京中科可来博电子技术有限公司
旋片真空泵	2XZ-4	浙江黄岩求精真空泵厂
真空电磁带空气阀	DDC-JQ25	北京中科科美真空技术有限责任公司
磨针仪	BV-10	Sutter Instrument Co.
倒角机	BV-10	Sutter Instrument Co.
pH 计	430	Laboration Equipment 公司
电子分析天平	Sartorius BS210S	北京赛多利斯仪器系统有限公司
移液枪	Eppendorf Reference, 200 μl , 1000 μl	法国 Gilson 公司
纯水系统	Simplicity185	Millipore S.A. France

表面等离子体激元共振仪	自组装	自组装
表面等离子体激元共振仪	BI-SPR1000	美国 Biosensing Instrument 公司

自组装 SPR 与相关文献中介绍的类似^[75, 76]。简要地说, 它采用的是 Kretschmann 棱镜耦合模式。我们用 BK7 半圆柱透镜作为 SPR 的棱镜, 在棱镜上放置一片镀有 2 nm 厚铬膜和 50 nm 厚金膜的 BK7 玻片, 玻片和棱镜之间滴加与棱镜折射率相同的浸镜油。激光方面, SPR 有两个二极管激光器, 其发射波长分别为 675 nm 和 785 nm, 可以选择其中之一与一个 LDC 500 激光驱动器 (Thorlabs, Newton, NJ) 连接起来。二极管激光器与 SPR 棱镜之间置有一片透镜, 用于将激光束聚集成直径可变的光斑。检测系统方面, 我们使用的是双单元光电检测器 (A 和 B, 比较图 1-9) 检测反射光, 具有高分辨率。数据采集方面, 我们通过 Labview 程序控制的数据采集卡记录 SPR 信号。根据相关文献报道, 可将数据采集卡记录采集的 $(A-B)/(A+B)$ 值转换成 SPR 共振角度的变化值^[77]。

SECM 仪器包括三部分: 探头 (包括电化学测量系统和探针的调节和扫描装置), 电子线路控制系统及微机实时控制系统。本实验在一个三电极模式下进行, 通过控制压电控制器来移动探针。SECM (CHI 900B, CHInstruments, Austin, TX) 工作电极为一支直径 10 μm 的金微电极探针。Ag/AgCl 和铂丝分别作为参比电极和辅助电极。

2.3 实验条件的优化

2.3.1 仪器校正系数的确定

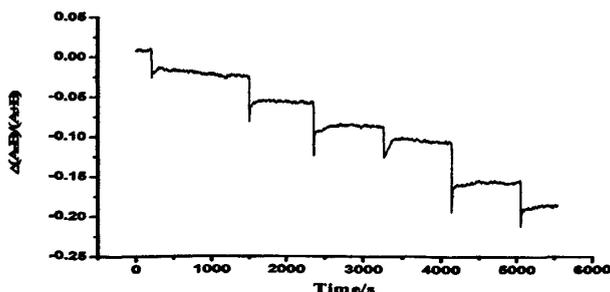


图 2-2 逐次加入无水乙醇的 SPR 信号曲线

Fig.2-2 SPR signal recorded during the process of absolute ethyl alcohol adding into water step by step

SPR 共振角的位移 $\Delta\theta$ 与 SPR 测得信号的变化 $\Delta[(A-B)/(A+B)]$ 是成正比的。为了将 SPR 测得的信号变化 $\Delta[(A-B)/(A+B)]$ 转变成 SPR 共振角的位移 $\Delta\theta$ ，我们需要通过酒精校正实验来确定 SPR 仪的校正系数，即 SPR 信号与 $\Delta\theta$ 的比例系数。

表 2-3 乙醇浓度 V% ~ $\Delta[(A-B)/(A+B)]$ Tab.2-3 Volume fraction of ethanol V%~ $\Delta[(A-B)/(A+B)]$

V%	$\Delta[(A-B)/(A+B)]$
0.0999	-0.0284
0.1996	-0.06407
0.2991	-0.09395
0.3484	-0.11245
0.4975	-0.16372
0.5964	-0.1936

酒精校正实验中，我们将金膜装入电化学池，向电化学池中注入 1 ml 纯水，调整黑线位置使之照射在双单元光电检测器正中央，调整双单元监测器 A 和 B 的值，等待 SPR 信号 $\Delta(A-B)/(A+B)$ 平衡。随后，逐次向电化学池中加入 1 μl 无水乙醇，图 2-2 为逐次加入无水乙醇的 SPR 信号曲线，直到 SPR 信号无明显阶跃现象为止。

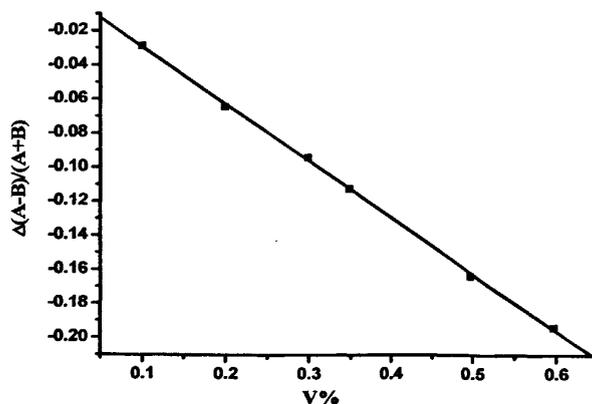


图 2-3 酒精校正线性拟合曲线

Fig.2-3 Fitting curve of ethanol Calibration

乙醇在水溶液中不会被 SPR 基底吸附, 所以 SPR 的吸收峰位移基本与溶液的折射率变化成正比。这个比例随仪器的设计和基底种类不同而变化。根据图 2-2, 取每段阶梯中点的纵坐标, 然后减去纯水阶梯 (第一个阶梯) 的纵坐标, 即可得到与 $\Delta\theta$ 有关的数据, 参见表 2-3。

由表 2-3 数据作乙醇浓度 $V\% \sim \Delta[(A-B)/(A+B)]$ 图, 并得到其拟合方程及相关系数, 如图 2-3 所示。经计算得到该曲线斜率为 -0.033372。通过比较标准斜率 0.08 ± 0.002 与乙醇线性拟合曲线的斜率得到本实验组装的 SPR 的仪器校正系数为 2.3972, 该系数与 $\Delta[(A-B)/(A+B)]$ 相乘便可得到 SPR 共振角度位移。

2.3.2 SPR 基底制备

本实验采用高频溅射法来制备金膜, 使用仪器为真空磁力溅射镀膜仪。高频溅射法工作原理是在 1.3×10^{-1} Pa 左右充入适量氩气, 在阴极 (柱状靶或平面靶) 和阳极 (镀膜室壁) 之间施加几百伏直流电压, 氩气被电离后在镀膜室内产生磁控型辉光放电。氩离子被阴极加速并轰击阴极靶表面, 将靶材表面原子溅射出来沉积在工件表面上形成薄膜。更换不同的靶材和控制不同的溅射时间可获得不同材质和厚度的薄膜。

镀膜时, 先将 BK7 载玻片 (Fisher) 在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 的 piranha 溶液 ($30\% \text{H}_2\text{O}_2 : 70\% \text{H}_2\text{SO}_4 = 3:1$) 中加热 30 min; 冷却后, 用大量二次水冲洗, 此后在 $\text{H}_2\text{O} : \text{HONH}_3\text{Cl} : 30\% \text{H}_2\text{O}_2 = 5:1:1$ (体积比) 的溶液中超声 60 min; 取出后, 用大量二次水冲洗, 再用氮气吹干。在阴极安装上铬靶后, 将刚处理的玻片置于镀膜机样品台上准备镀膜。首先在氩气氛围内镀铬 295 s, 得到厚度为 2 nm 的铬膜, 以使金膜能更加紧密地结合在玻片上; 再换上金靶, 镀 320 s, 得到厚度为 50 nm 的金膜。

在镀膜前后要注意防尘, 以免玻片上沾有污物而阻碍金属原子与玻片紧密结合。

将镀好的金膜用氢火焰退火 2-4 min, 使玻片上的金原子重排, 得到更均匀的金膜表面, 同时去除金膜表面污染物。金膜退火即可进行修饰。

2.3.3 MT 的表面固定

修饰时采用共价氨基偶联法固定 MT (见图 2-4)。先将金膜置于盛有 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MUA 的无水乙醇溶液 (5.5 mL) 的泡膜池中, 浸泡 12-24 h, 使其表面形成一层巯基自组装单层 (self-assembled monolayer, SAM); 随后再利用氨基偶联法使偶联剂与 MT 表面相应的功能基团发生共价键合, 即用含 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDC 和 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NHS 的 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液组装 30 分钟, 再用含 $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MT 的 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液组装 3 h (组装时间不宜过长)。

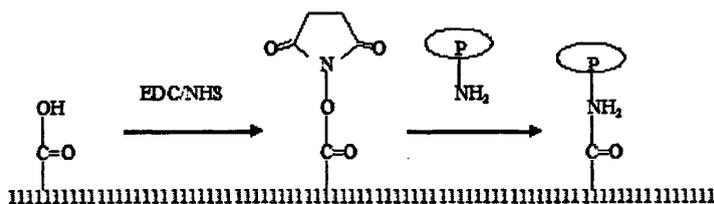


图 2-4 氨基偶联法固定 MT 的原理图

Fig.2-4 principle scheme of immobilizing MT by amino coupling agent

经过自组装后,用大量二次水冲洗膜片洗去物理吸附在薄膜表面的多余混合液。再用氮气小气流(防止吹掉组装在玻片上的 MT)吹干,立即装池使用。

利用 MUA 固定 MT 的优点是程序简单;自组装膜更加致密;分子膜的重排引起的水化效应的影响小,而水化效应直接影响自组装膜的折射率;同时固定的 MT 分子不存在内在金属离子严重流失的问题。正由于这些优势,用 MUA 固定的 MT 膜方向性更均一。

2.3.4 表面组装 MT 的定量

利用 FI-SPR 检测 MT 在金膜表面的覆盖度。将 MUA 自组装膜放置在 BI-SPR 1000 仪器的棱镜上。以 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液为载液,先后依次注射 EDC (EDC $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} + 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) -NHS (NHS $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} + 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) 混合液和 MT (MT $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} + 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) 溶液,流速为 $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。组装好 MT 后,用 Gly-HCl ($\text{pH}=2$, Gly $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 将 MT 中的 Zn^{2+} 洗脱除去,得到 apo-MT。随后,注射 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CuSO}_4 + 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液。

由图 2-5 知,将 EDC 和 NHS 的混合溶液以及 MT 溶液分别注射进入装有 MUA 修饰的金膜的流通池,MT 组装上金膜后,SPR 角发生 0.20° 的位移。由于 1° 的 SPR 共振角位移 $\Delta\theta$ 相当于蛋白质 $10 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ 的表面密度,与蛋白质的尺寸无关^[78]。据此计算,MT 表面密度是 $2.0 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ 或 $33 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$,那么激光照射区域(直径约为 $700 \mu\text{m}$) MT 的量约为 0.14 pmol 。

随后,利用 Glycine-HCl 缓冲液除去 MT 中的金属离子,原因在于质子可以取代蛋白质中与金属结合的位点,而甘氨酸能螯合释放出来的金属离子^[79]。我们发现 Glycine-HCl 缓冲液能够有效地除去固定在金膜表面的 MT 中的金属离子。Glycine-HCl 洗脱 MT 中的金属离子引起净 SPR 信号约为 0.010° (见图 2-5 的插图),这归因于 MT 中金属质量的减少和 MT 构型的变化。注射第二次 Glycine-HCl 缓冲液时,不会再引起任何显著的 $\Delta\theta$ 变化,即注射一次就足以除去 MT 分子中所有的金属离子。因此,为了避免 Glycine-HCl 缓冲液对 MT 组装层过度的降解作用,在 FI-SPR 实验中只注射一次,SECM-SPR 实验中 Glycine-HCl 洗脱 15 min。

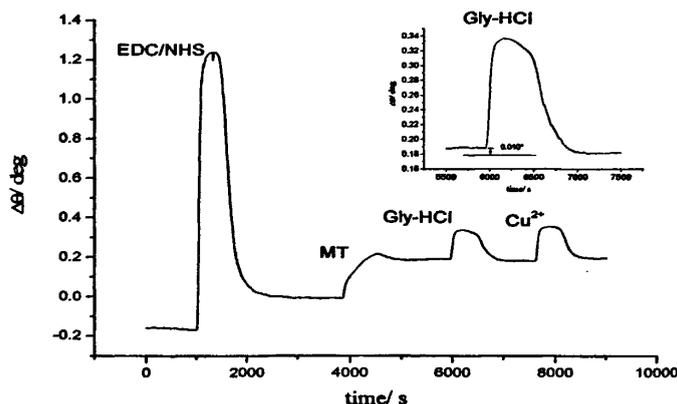


图 2-5 FI-SPR 检测图

Fig.2-5 FI-SPR detection

为定量金基底上预组装的 apo-MT 捕获的铜离子，我们以 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速注射 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4 + 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$)，并计算出结合铜离子时 SPR 共振角的净位移约为 0.010° 。

2.3.5 探针向基底的逼近

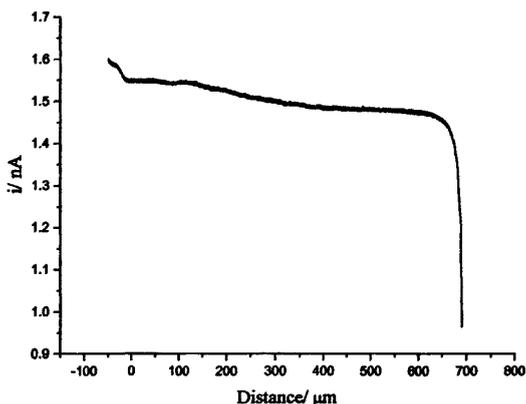


图 2-6 探针在 MV 溶液 ($1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MVCl}_2 + 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 溶液) 中的逼近曲线，探针逼近电位为 -0.7 V ，终点电流比率为 60%

Fig.2-6 The approach curve detected by tip in MV solution ($1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MVCl}_2 + 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ solution), the approach potential is -0.7 V , the terminal current ratio is 60%

固定加载了 SPR 基底的棱镜与聚四氟乙烯电解池^[12]，调整电解池和预沉积了铜的微电极探针位置，使微电极探针处在激光光斑上方。然后向电解池中加入 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MVCl}_2 + 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 溶液，通过控制 SECM 探针上 MV^{2+} 还

原的反馈电流实现探针向基底表面逼近（见图 2-6）。

当达到探针/基底的最适距离(d)时，将 $\text{MVCl}_2 + \text{NaCl}$ 溶液用移液管移出，冲洗电解池。

2.4 结果与讨论

2.4.1 SECM-SPR 检测 apo-MT 与铜离子的结合

1) 工作原理

铜离子和 apo-MT 的结合数取决于 MT 分子的结构和金属组成^[72]。Stillman 等人对 apo-MT 与 Cu^{2+} 键合作用做了活体外滴定分析，并对 Cu^{2+} 与 Cd、Zn-MT 相互作用进行光谱研究，通过不同的键合化学计量法说明了 Cu_{12} -MT 是稳定结构^[56, 68, 72]。同时，在 Cu^{2+} 与 apo-MT 结合过程中， Cu^{2+} 到 Cu^+ 的还原过程伴随了部分 MT 的氧化作用（MT 中一些半胱氨酸残基的氧化作用）^[73, 74]。在 Cu_{12} -MT 中， Cu^+ 离子均匀的分布在两个结构域，形成了 Cu_6S_9 和 Cu_6S_{11} 的三角形结构。

紫外-可见，圆二色谱，和发光光谱滴定方法已经有效地推演出金属与 MT 结合达稳定结构时的结合情况，但在铜离子/MT 键合和金属离子释放过程动力学方面未进行过相关研究。

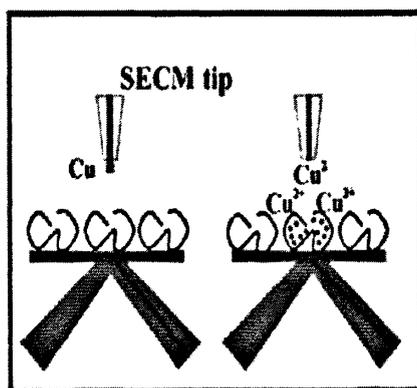


图 2-7 实时 SECM-SPR 检测 SPR 基底固定的 apo-MT 捕获 SECM 探针上溶出的铜离子过程图，图中 SECM 探针， Cu^{2+} ，MT 分子和激光束并未按比例绘制，同时，绘出了 apo-MT 和 MT 分子的 α 、 β 结构域

Fig.2-7 Schematic representations of the real-time SECM-SPR monitoring of sequestration of Cu^{2+} stripped and diffused from the SECM tip by apo-MT molecules anchored at the SPR substrate, conformations of apo-MT and MT molecules with α and β domains are presented.

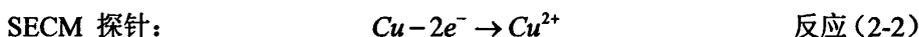
基于以上信息，我们选择 Cu^{2+} 与 apo-MT 的相互作用体系作为研究对象，拓

展扫描电化学显微镜 (SECM) 与表面等离子体激元共振 (SPR) 联用技术在实时检测固/液界面上化学或生物激励诱导的蛋白质结构变化和动力学变化方面的应用。

实验中, 在预沉积了铜的 SECM 探针上电化学溶出 Cu^{2+} , Cu^{2+} 扩散到 SPR 基底, 并与基底上的 apo-MT 结合, 诱导 MT 发生构型变化, 从而产生 SPR 角度偏移 (见图 2-7)。

在 d 距离处, 在探针上阳极氧化的铜离子迅速扩散到 SPR 基底, 并与 apo-MT 分子结合, 这一金属键合反应会导致 MT 膜的折射率发生变化, 因此实时分辨的 SPR 共振角位移可以说明捕获过程的动力学以及确定基底上稳定的 MT 结构/构型。

以上过程中, SECM 探针和 MT 覆盖的 SPR 基底上发生如下反应:



反应 (2-2) 中生成的 Cu^{2+} 在到达 SPR 基底并与 apo-MT 结合时, 先被 MT 的部分半胱氨酸残基还原为 Cu^+ , 同时 MT 的这部分半胱氨酸残基发生了氧化^[73, 74]。 Cu^+ 与 apo-MT 的键合数 (x) 取决于到达 SPR 基底的 Cu^{2+} 离子数量。

2) SECM-SPR 测量预处理

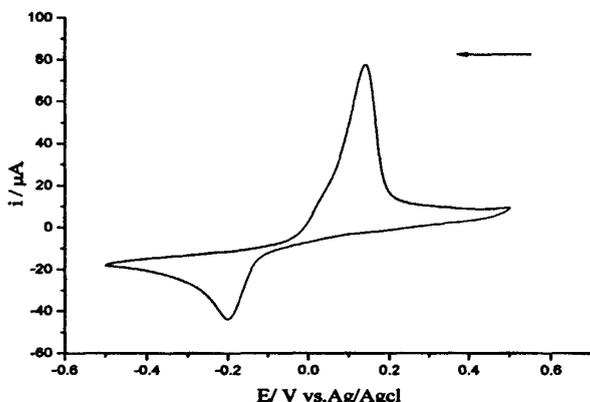


图 2-8 金盘电极在 CuSO_4 溶液 ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4 + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ 溶液) 的循环伏安图, 扫描速率为 $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, 表示扫描方向

Fig.2-8 cyclic voltammogram of gold electrode in CuSO_4 solution ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4 + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ solution), scanning rate is $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, arrow shows the scanning direction

由 CuSO_4 溶液 ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4 + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ 溶液) 的循环伏安曲线 (如图2-8), 确定铜的沉积电位 (-0.3 V), 溶出电位 (0.13 V)。

将 $10 \mu\text{m}$ 直径的 SECM 金探针置于 Cu^{2+} 溶液 ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4 + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ 溶液) 中, 以 -0.3 V 电位下电化学沉积铜, 沉积时间分别为 10、20、40 和 50 s。

然后向电解池中注入 Gly-HCl ($\text{pH}=2$, Gly $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 缓冲溶液洗脱固定在 SPR 基底的 MT 分子中的金属离子。随后用去离子水冲洗电解池, 并注入已除氧的 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 溶液。待状态稳定后, 在 SECM 探针上施加 0.13 V 的电位阳极氧化探针上预沉积的铜, 同时用 SPR 检测共振角的位移。实验在室温下氮气氛围内完成。

3) 实验结果与分析

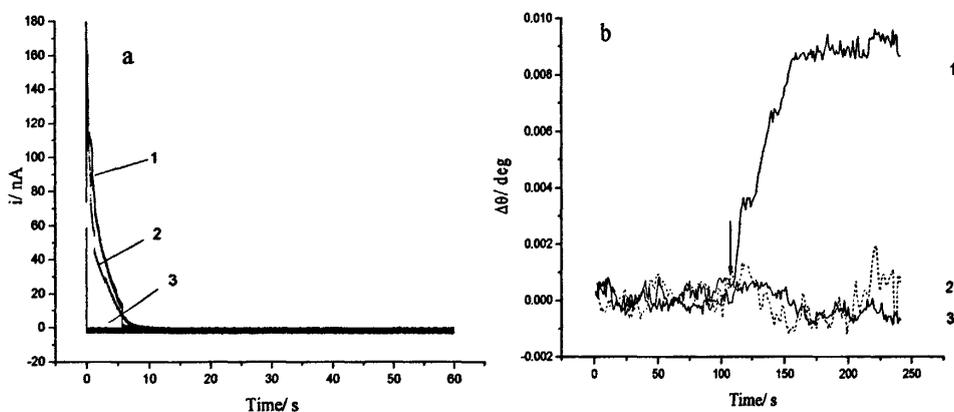


图 2-9 金探针上预沉积的铜在 0.13 V 电位下的阳极氧化电化学曲线 (a 图中曲线 1) 和与之相应的组装了 apo-MT 的 SPR 基底上 SPR 共振角位移-时间图 (b 图中曲线 1) 以及相同条件下, 在仅组装了 MUA SAM 的 SPR 基底上测得的实验数据 (a、b 图中曲线 2); a、b 图中的曲线 3 对应的是未预沉积铜的金探针在组装了 apo-MT 的 SPR 基底上检测到的电化学信号和 SPR 共振角位移-时间图, 实验中 d 约为 $6 \mu\text{m}$, 图 b 中箭头表示探针上铜氧化的起始时间

Fig.2-9 A chronoamperogram of anodic stripping of copper coated onto an Au tip upon stepping the potential to 0.13 V (curve 1 in panel a) and the corresponding SPR dip shift-time diagram at a SPR substrate covered with apo-MT (curve 1 in panel b), the same measurement was conducted at a SPR substrate covered with MUA SAM (curves 2 in both panels), the curves 3 in both panels represent the chronoamperogram at a bare Au tip and the corresponding SPR dip shift-time diagram at an apo-MT-covered SPR substrate, respectively, all the measurements were conducted at $d \approx 6 \mu\text{m}$, the arrow in panel b indicates the time when Cu was stripped at the tip

实验中有两组空白实验（见图 2-9）：第一个空白实验条件是 Cu^{2+} 从 SECM 探针上扩散到仅组装了 MUA SAM 的 SPR 基底（虚线 2）；另一个是未预沉积 Cu 的金探针在组装了 apo-MT 的基底上施加 0.13 V 电位检测到的电化学信号和 SPR 共振角位移-时间信号（实线 3）。两个控制实验中，基底上 SPR 信号仅在水平线上发生微小波动（即为噪音信号），这说明在实线 1 中 SPR 共振角位移信号出现的较大阶跃正是由 apo-MT 捕获金属而产生。

由图 2-9b 中实线 1 可见，在 SECM 探针上生成 Cu^{2+} （大约 100 s 处，箭头所示）后，基底上 SPR 信号发生变化。图中整个 SECM-SPR 的检测范围（4-5 min）内出现了三个平台。这三个平台说明，apo-MT 捕获不同数量的 Cu^+ 过程中存在三个相对稳定的 MT 结构/构型，那么在 apo-MT 结合 Cu^+ 过程中，实时分辨的 SPR 信号中的平台可能与预沉积在金探针上的铜数量具有一定的内在联系。

当控制金探针上预沉积的铜的数量，并进一步进行 SECM-SPR 检测时，这一推测得到证实（见图 2-10）。

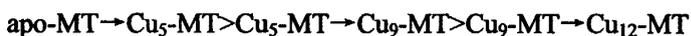
由图 2-10a 可知，对四组电化学数据中的法拉第电流进行积分，可计算出预沉积在金探针上铜的量，由此可以对金探针上溶出的铜进行定量。同时，通过精确控制预沉积铜的量，还可以确定 MT 分子中金属含量（x）和 apo-MT 分子捕获金属离子的速率：

$$x = \frac{n_{\text{Cu}^+}}{n_{\text{MT}}} = \frac{n_{\text{溶出的 Cu}^{2+}}}{n_{\text{SPR 基底上组装的 MT}}} \quad \text{公式 (2-1)}$$

式中，SPR 上组装的 MT 可以通过单独的 FI-SPR 实验测定（见 2.4.1）。

在图 2-10b 中出现了三个 SPR 平台信号，对应了 apo-MT 捕获不同数量的 Cu^+ 过程中存在的三个相对稳态。其中，实线 1 中最高平台信号与虚线 2 具有很高的可比性。这说明一旦从 SECM 探针上溶出大量的 Cu^{2+} ，足以占据 MT 中所有键合位点，那么 MT 膜的折射率与溶液中过量的 Cu^{2+} 无关，即过量的 Cu^{2+} 不会引起 SPR 信号的变化。

与图 2-10a 电化学信息相结合可知，图 2-10b 中三种稳态结构对应的 Cu^+/MT 的摩尔比为 5、9、12，即得到的 Cu-MT 物质分别为 $\text{Cu}_5\text{-MT}$ 、 $\text{Cu}_9\text{-MT}$ 、和 $\text{Cu}_{12}\text{-MT}$ 。而得到这三种结构/构型的反应速率（由表 2-4 得）大小排序依次为：



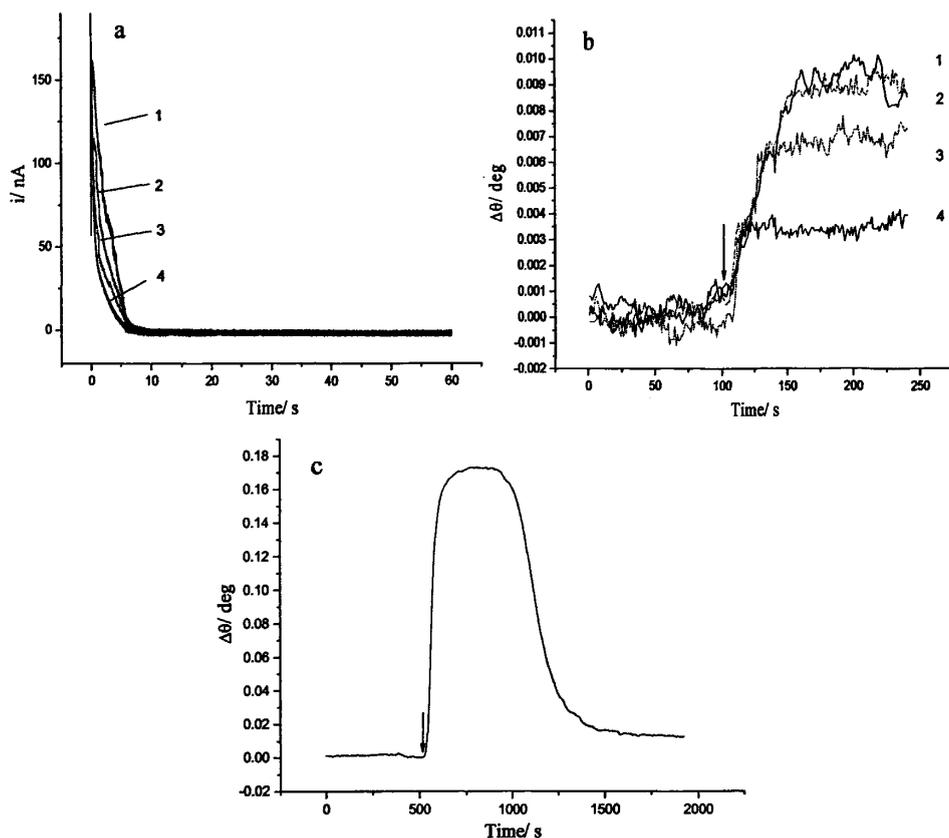


图 2-10 预沉积了不同量的铜的金探针上阳极氧化的电化学曲线 (a)，四条曲线由上至下分别对应了预沉积的铜的量为 2.41 (1)、1.78 (2)、1.32 (3)、0.73 pmol (4)，同时记录了组装有 apo-MT 的 SPR 基底上的 SPR 共振角位移-时间图 (b)，d 约为 $6 \mu\text{m}$ ，箭头表示探针上铜发生氧化的起始时间，图 (c) 是流动注射-SPR 实验中检测到的表面固定的 apo-MT 结合 Cu^{2+} ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 SPR 信号，载液是 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl，流速为 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ，进样环尺寸为 $50 \mu\text{L}$ ，箭头表示开始进样

Fig.2-10 Chronoamperograms corresponding to anodic stripping of different amounts of Cu predeposited onto Au tips (a), the amounts of Cu predeposited were 2.41 (1), 1.78 (2), 1.32 (3), and 0.73 pmol (4), the time-resolved SPR dip shifts recorded simultaneously with the chronoamperograms at SPR substrates covered with apo-MT are shown in (b), $d \approx 6 \mu\text{m}$, the arrow indicates the start of anodic stripping of Cu, in (c), a representative SPR sensorgram corresponding to the sequestration of Cu^{2+} ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) by immobilized apo-MT is shown, the carrier solution is $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl and a flow rate of $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ and a $50 \mu\text{L}$ sample loop were used, the arrow indicates the time when the injection was made

表 2-4 apo-MT 结合 Cu^{2+} 的 SECM-SPR 数据表Tab.2-4 SECM-SPR measurements of the Cu^{2+} sequestration by immobilized apo-MT

	$\text{Apo-MT} \rightarrow \text{Cu}_5\text{-MT}$	$\text{Cu}_5\text{-MT} \rightarrow \text{Cu}_9\text{-MT}$	$\text{Cu}_9\text{-MT} \rightarrow \text{Cu}_{12}\text{-MT}$
SECM 探针上溶出 Cu^{2+} 的量 (pmol)	0.73 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.46 ± 0.02
达到下一稳态时 SPR 共振角位移 (mdeg)	3.4 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.3
达到下一稳态所需时间 (s)	26 ± 3	22 ± 2	26 ± 5
达到下一稳态的速率 (mdeg·s ⁻¹)	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.096 ± 0.02
MT 分子中 Cu^+ 含量 (x)	5.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2	3.2 ± 0.1
MT 与 Cu^+ 的结合速率 (s ⁻¹)	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.12 ± 0.02

另外, 图 2-10b 中不同量的 Cu^{2+} 释放过程中, SPR 曲线增长情况几乎一致, 说明了 MT 与金属结合的动力学不受 SECM 探针-SPR 基底间距内的 Cu^{2+} 的传质速率的影响。这一结果表明, 在 SECM 探针与 SPR 基底间距 d 内引入具有高传质速率 (本实验中指铜的溶出) 性质的 SECM 探针有利于 SPR 动力学测量。在 SECM 探针处生成的 Cu^{2+} 扩散到 SPR 基底的时间 t 为

$$t = \frac{d^2}{D} \quad \text{公式 (2-2)}$$

式中, D 是 Cu^{2+} 的扩散系数, 取 $D=1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [80], $d=6 \mu\text{m}$, 则扩散时间 t 为 0.036 s 。

在传统的 FI-SPR 或光谱滴定分析法中, 从本体溶液到传感器表面或者滴定剂与样品混合的有限传质有碍于对快速化学反应的检测。我们进行的 FI-SPR 实验中, 在流通池中注射了 $50 \mu\text{L}$ 的 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 后, 固定在 SPR 基底的 apo-MT 捕获金属成为 $\text{Cu}_{12}\text{-MT}$, 得到的 SPR 信号并没有出现中间的平台 (如图 2-10c 中所示, 进样后产生的信号峰是由 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 溶液引起)。图 2-10c 中注射 Cu^{2+} 溶液前后 SPR 信号的净变化约为 0.010° , 这与图 2-10b 中实线 1、2 对应的

SPR 信号变化非常吻合 (FI-SPR 与 SECM-SPR 实验结果的微小差别出自于两种实验方法的试验条件存在些微的区别)。如果 SECM 仪器可以使 d 的值为 $1\ \mu\text{m}$ 或更小^[81], 那么时间域将被缩短至几毫秒或更短, 那么 SECM-SPR 联用技术在快速动力学分析方面将堪比于高级停流混合技术^[82]。

我们已经介绍过 SPR 共振角位移和 SPR 基底收集效率的数量级取决于探针-基底间距 d ^[12]。传统的 SECM 探针生成/基底收集模式中, 由于基底的尺寸是探针直径的四倍, 单位收集效率需在间距大小不超过探针半径情况下得到^[112,113]。而在我们的 SECM-SPR 实验中, 由于 SECM 探针电极 (直径为 $10\ \mu\text{m}$) 的面积远小于照射在 SPR 基底上的激光光斑的大小 (直径约为 $500\ \mu\text{m}$), 因此在 d 约为 $10\ \mu\text{m}$ 处, 就能得到较高的收集效率。然而, 如上所述, 由于扩散时间与探针/基底间距的平方成正比, 则将探针放置在 $10\ \mu\text{m}$ 以内可以保证 Cu^{2+} 易于传质而不成为速控步骤。

表 2-4 可知, 得到三种稳定的 Cu-MT 结构的速率不同, 说明 Cu-MT 结合过程中存在键合-重组-平衡过程^[55]。由文献知, MT 的脱金属过程几乎没有多肽主链的构型重组, 而且 apo-MT 主要保留着 MT 的二级结构^[83]。本实验所用 apo-MT 是通过脱去 Zn_7 -MT 中呈四面体构型结合的 Zn 获得的, 因此, apo-MT 的二级结构应该与对 Zn^{2+} 饱和的 Zn_7 -MT 的结构相似。apo-MT 最初与金属结合时, 其上所有结合位点都可与金属键合, 并且键合速率很高 (这一过程是动力学控制或者在传质较慢的情况下为传质控制)。然而一旦某些位点被结合, 由于 MT 的立体化学刚性增强^[84], 金属键合的速率将减慢, 从而 MT 分子中金属离子的重排或再分配作用将更加缓慢^[114]。在初始的金属键合阶段, Cu^+ 离子由 MT 的 α 域转移至 β 域的过程是热力学优先过程, 因此, 在一定时间内, Cu^+ 离子将在 α 域和 β 域之间均匀分配, 并最终形成 Cu_{12} -MT。

可见, 图 2-9b 和图 2-10b 中曲线说明 SECM-SPR 能够用于实时检测 Cu_x -MT 的构型变化。

2.4.2 SECM-SPR 检测 Cu_{12} -MT 的铜离子释放

1) 工作原理

对于逆过程 (Cu-MT 的金属释放), 我们在 Cu_{12} -MT 基底上进行实验。通过在 SECM 探针上施加电位氧化溶液中的对苯二酚, 产生 H^+ 增大局部区域内溶液酸度, 使 MT 释放铜离子, 再次发生构型变化, 导致 SPR 角度发生偏移 (如图 2-11)。

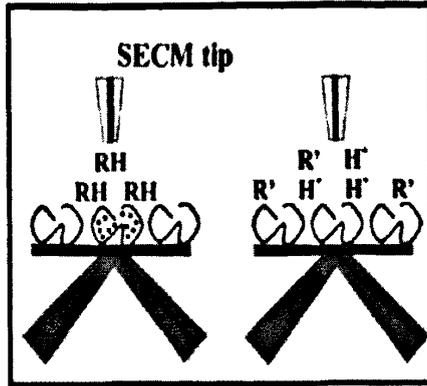
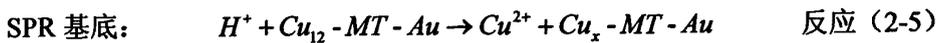
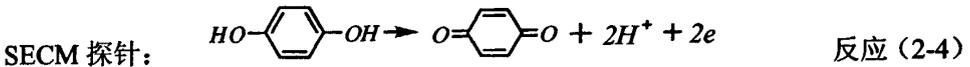


图 2-11 实时 SECM-SPR 检测 SECM 探针处氧化质子化试剂释放质子诱使基底固定的 MT 释放金属的过程，图中 SECM 探针，Cu²⁺，MT 分子和激光束并未按比例绘制，同时，绘出了 apo-MT 和 MT 分子的 α、β 结构域

Fig.2-11 Schematic representations of the real-time SECM-SPR monitoring of metal release from immobilized MT molecules caused by protons generated from a redox reaction (e.g., hydroquinone oxidation) at the SECM tip, for clarity, the SECM tip, Cu²⁺ ions, MT molecules and the laser beam are not drawn to scale, conformations of apo-MT and MT molecules with α and β domains are presented.

实验中，SECM 探针处电化学氧化对苯二酚 HQ，同时引起基底上发生如下反应：



氧化对苯二酚，释放质子（见反应 2-4），这使 SECM 探针/SPR 基底间隙内的 pH 值剧烈变化。由于强酸环境能使 MT 脱去已结合的金属^[68, 85]，那么组装在 SPR 基底的 MT 分子的结构将发生变化，从而使 SPR 共振角位移发生变化。

2) SECM-SPR 测量预处理

通过循环伏安法在对苯二酚 (HQ) 溶液 (5.0 mmol·L⁻¹ HQ + 0.1 mol·L⁻¹ NaCl 溶液) 中测得 HQ 的氧化还原电位 (如图 2-12)，确定探针上施加的 HQ 氧化电位 (0.7 V)。

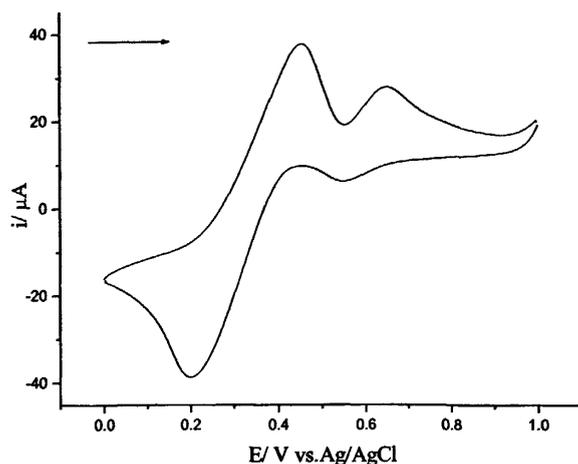


图 2-12 金盘电极在对苯二酚溶液中 ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HQ + $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液) 的循环伏安图, 扫描速率为 $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, 箭头表示扫描方向

Fig.2-12 cyclic voltammogram of gold electrode in hydroquinone solution ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HQ + $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl solution), scanning rate is $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, arrow shows the scanning direction

在修饰好 MT 的金膜后, 吹干并装池, 再用 Gly-HCl ($\text{pH}=2$) 对固定在金膜上的 MT 进行洗脱, 去除 MT 中的金属离子 (Zn^{2+}), 随后, 用大量二次水和 NaCl 溶液洗去 Gly-HCl, 最后, 在电化学池中加入已除氧的 CuSO_4 溶液, 使 apo-MT 与 Cu^{2+} 充分结合, 形成 Cu_{12} -MT, 整个过程要在氮气氛围内完成。

随后, 向电解池中注入刚配好并已除氧的 HQ 溶液。待状态稳定后, 在 0.7 V 电位下氧化对苯二酚生成对苯醌, 在探针上生成的质子扩散到 SPR 基底, 增加了探针下方局部区域内的酸度, 即降低了该区域内的 pH 值, 使 MT 分子释放金属离子, MT 发生的构型变化用 SPR 检测。实验在室温下氮气氛围内完成。

3) 实验结果与分析

实验结果如图 2-13 所示。空白组实验是在不含对苯二酚 HQ 的溶液条件下获得的, 数据见图 2-13a、b 中曲线 2, 可见此时, 探针上没有 H^+ 释放时, 施加电位前后 SPR 信号基本保持恒定。

图 2-13a 中的曲线 1 对应了组装了 Cu_{12} -MT 的 SPR 基底上方 SECM 探针电化学氧化对苯二酚 HQ 的多步阶跃电流-时间图。与之相应的是图 2-13b 中的曲线 1, 即在探针上开始施加电位后, SPR 信号渐渐开始变化并且电位停止后 (100 s), SPR 信号仍在变化, 直至达到最终的稳定状态, 整个过程中出现两个中间平台。与空白组实验数据对比可知, 曲线 1 即为探针电化学生成质子诱导 MT 分子释放金属过程中产生的 SPR 信号。

对图 2-13a 中的曲线 1 进行积分 ($d=5 \mu\text{m}$), 得到探针处生成的质子的量约

为 31.8 pmol , pH 值接近 1.4。尽管这个值略高于在溶液中得到 apo-MT 的酸度 ($\text{pH} \sim 0.5$)^[86], 但从实验数据推测, 表面固定的 Cu_{12} -MT 脱去金属的最终稳态很可能是 apo-MT, 因为图 2-13b 中的曲线 1 的 SPR 信号净变化 ($\sim 0.0094^\circ$) 与图 2-9b 中的曲线 1 的 SPR 信号净变化 ($\sim 0.0085^\circ$) 非常相似。而且, 由图 2-13b 的曲线 1 可知, 在 SECM 探针上已不再生成质子之后 (100s 之后), SPR 信号仍在变化。由 Cu_{12} -MT 到 apo-MT 的变化持续了超过 200 s, 这远远长于 apo-MT 捕获探针产生的 Cu^{2+} 所需要的时间 ($\sim 100 \text{ s}$)。由此可知, 质子引起 MT 释放金属所需的时间要比 apo-MT 结合金属要长一些, 不过, 由图 2-13b 中虚线箭头所示, 两个中间平台相对窄些, 可推知, 在酸性环境下, 中间态的结构稳定性较差。

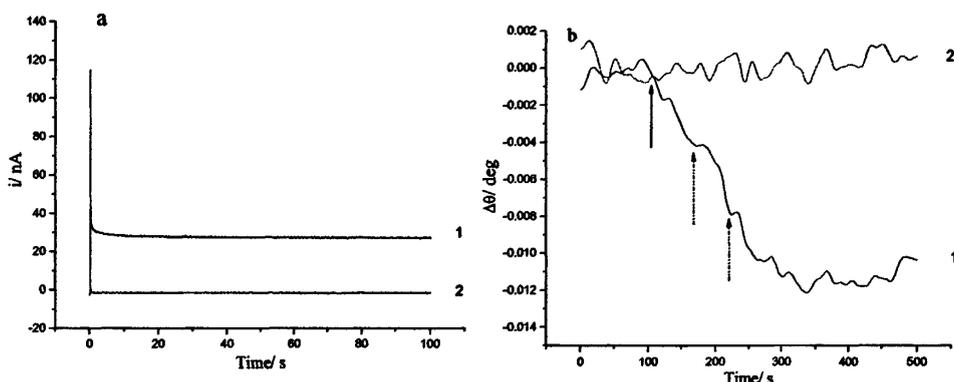


图 2-13 组装了 Cu_{12} -MT 的 SPR 基底上方 SECM 探针在 0.7 V 电位下 $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HQ+ $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl 溶液中测得的多步阶跃 I-t 曲线(a 图中曲线 1)和在不含 HQ 的 $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl 溶液中测得的多步阶跃 I-t 曲线 (a 图中曲线 2), 电位由 0.2 V 阶跃至 0.7 V , 及与其相应的 SPR 共振角位移-时间图 (b 图), 实验中 d 约为 $5 \mu\text{m}$, b 图中实线箭头指示电位阶跃起始处, 虚线箭头表示 SPR 共振角位移-时间曲线中出现的两个中间平台。

Fig.2-13 Chronoamperograms recorded at SECM tips positioned over SPR substrates covered with Cu_{12} -MT in $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HQ+ $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl solution (curve 1 in panel a) and $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl solution without HQ (curve 2 in panel a), the potential was stepped from 0.2 to 0.7 V , the corresponding SPR dip shift-time diagrams are shown in panel b, $d \approx 5 \mu\text{m}$, the solid arrow in panel b shows the end of the potential step and the dotted arrows indicate the two intermediate plateaus observed in the SPR dip shift - time curve

图 2-13b 中曲线 2 对应的是基线 (即对照试验数据), 排除小于基线噪音信号标准偏差三倍 (3σ) 的信号 ($\sim 0.001^\circ$), 则相对较大的角度变化信号 (如图 2-13b 中, 在 250 s 处的平台信号) 不作 Cu-MT 中间态信号考虑。图 2-13b 中的两个中间态平台已经重复实验证实。

2.5 小结

SECM-SPR 检测中,表面固定的 apo-MT 与铜离子结合得到 Cu_{12} -MT 过程中,随着结合数增加, Cu_x -MT 构型也发生变化,其中经历了三种稳态结构。并且,在结合数为 12 后,SPR 信号不再发生变化,此时 MT 达到饱和。微区内,过量的铜离子不会对 SPR 信号产生影响。

铜离子与 MT 结合过程中的三种稳态结构对应的 Cu_x -MT 分子中 Cu 含量 x 分别为 5、9、12。并且,得到三种稳态产物 (Cu_5 -MT、 Cu_9 -MT 和 Cu_{12} -MT) 的反应速率不同,大小顺序依次为 $\text{apo-MT} \rightarrow \text{Cu}_5\text{-MT} > \text{Cu}_5\text{-MT} \rightarrow \text{Cu}_9\text{-MT} > \text{Cu}_9\text{-MT} \rightarrow \text{Cu}_{12}\text{-MT}$ 。

对于逆过程,即 Cu_{12} -MT 释放铜离子实验,我们发现微区内氢离子浓度增大时,表面固定的 Cu_{12} -MT 分子即开始释放铜离子,在探针上氢离子停止产生后,MT 的铜离子释放过程仍在进行,整个过程也出现了三种稳态结构。不过,释放过程中的中间态历时较短(中间平台较窄),可见,酸性环境下,中间态的结构稳定性较差。并且,释放铜离子过程中得到的最终产物很可能是 apo-MT。

将两个过程进行比较发现, $\text{Cu}_{12}\text{-MT} \longrightarrow \text{apo-MT}$ 的变化持续了超过 200 s 时间,而其逆过程 $\text{apo-MT} \longrightarrow \text{Cu}_{12}\text{-MT}$ 仅经历了 100 s,可见,质子引起 MT 释放金属所需的时间比 apo-MT 结合金属要长。

综合分析两个过程所得结果,可以说明 SECM-SPR 联用技术研究 MT 与铜离子相互作用模型可行,SECM-SPR 联用技术可用于研究生物分子的键合和解离反应。

第三章 硫蛋白与 Hg^{2+} 的相互作用研究

3.1 引言

汞是一种广泛存在于自然界的人体非必需元素。随着近代工业的发展,它在生产和生活中的应用日益广泛,从而汞对环境和人群健康的危害也越来越大。汞在自然界有三种存在形式:即元素汞(Hg)、无机汞(Hg^+ 、 Hg^{2+})和有机汞。各种形态的汞及其化合物都会对机体造成以神经毒性和肾脏毒性为主的多系统损害。

汞及其化合物能够产生广泛的毒性效应,总体上说最主要的一个原因是:汞(甲基汞)具有很强的亲硫基性,能够与体内众多富含巯基的膜蛋白相结合,影响蛋白功能,从而导致多系统发生毒性效应^[87]。大量的生物毒性试验证明,当汞离子与生物大分子上的活性点或非活性点位结合后,可以改变生物大分子正常的生存和代谢功能,使生物体表现为中毒现象,甚至死亡^[88]。虽然生物体内含有金属硫蛋白及类金属硫蛋白,其半胱氨酸上的巯基对汞有很高的亲合力,能够牢固地结合大量汞,起到重金属解毒作用,但生物体对汞的积累能力是有限的。当他们摄入的汞过量,蓄积能力饱和后,就会发生“溢出”现象,生物体开始发生病变。

目前为止, Hg -MT 键合特性的研究仍以光谱法(紫外-可见吸收和圆二色谱法)^[56,90,93,95,101]为主,检测到几种 Hg -MT 的结合数,并讨论了 Hg^{2+} 结合 MT 过程中 Hg^{2+} 与 MT 结合时间和配离子存在等因素的影响。 Hg -MT 的电子光谱数据 displays Hg_7 -MT 中 Hg^{2+} 与结合位点呈类四面体的几何构型^[89]。随后 Johnson 和 Armitage 的紫外光谱数据说明 Hg^{2+} 滴定 Cd_7 -MT 过程中,最初 Hg^{2+} 以四面体结构占位,当 Cd -MT 与 Hg^{2+} 结合数超过 4,则以直线型结合。X 射线吸收研究显示, Hg_7 -MT 中 Hg -S 键长有 2.33 Å 和 3.4 Å 两种, Hg^{2+} 以变型四面体结构结合^[90, 91]。而扩展 X 射线吸收精细结构法(extended X-ray absorption fine structure, EXAFS)检测 Hg_7 -MT 得出 Hg -S 键长为 2.42 Å, Hg^{2+} 与巯基以三配位结合^[92]。Leiva 等的光谱滴定数据显示,在 $\text{pH}=3$ 时,汞过量时,产物为 Hg_{18} -MT^[95]。而 $\text{pH}=2$ 时, Lu 和 Stillman 的 CD 光谱数据显示 Hg /MT 比例不同,配位结构也发生变化,并且两者配比在 7 时出现一个吸收峰,在 8-14 为平台,到 18 时,又出现一个吸收峰,说明 7 时的四面体配位结构变为 11 时的三角型结构又变为 18 时的对角型结构^[90, 93]。

本章,我们将已建立的 SECM-SPR 研究 Cu -MT 模型应用于 apo-MT 与 Hg^{2+}

的结合过程, 探索界面上 Hg-MT 的结合性质, 即将 SECM 探针上预沉积的汞氧化溶出 Hg^{2+} , Hg^{2+} 扩散到 SPR 基底, 并与基底上的 apo-MT 结合, 诱导 MT 发生构型变化, 从而产生 SPR 角度偏移。

3.2 实验部分

3.2.1 实验试剂及材料

实验所用试剂及材料如表 3-1 所示:

表 3-1 实验试剂及材料

Tab.3-1 The chemicals and materials

名称	分子式	分子量 (g/mol)	纯度	产地	
硫酸	Sulfuric Acid	H_2SO_4	98.08	优级纯	焦作市化工三厂
30%过氧化氢	Hydrogen Peroxide	H_2O_2	34.01	分析纯	上海桃浦化工厂
盐酸羟胺	Hydroxylamine	HONH_2Cl	69.49	分析纯	湖南高纯化学试剂厂
	Hydrochlorid				
铁氰化钾	Potassium Hexacyanoferrate (III)	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	329.25	分析纯	湖南, 湘中地质实验研究所
氯化钾	Potassium Chloride	KCl	74.55	分析纯	焦作市化工三厂
氯化钠	Sodium Chloride	NaCl	58.44	分析纯	焦碱集团化学试剂厂
磷酸氢二钾	di-Potassium Hydrogen Phosphate	K_2HPO_4	174.2	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich 公司
	Potassium				
磷酸二氢钾	di-Hydrogen Phosphate	KH_2PO_4	136.09	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich 公司
	Potassium				
巯基十一羧酸	11-mercaptoundecanoic acid, MUA	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$	218.36	$> 98\%$	Aldrich(Milwaukee, WI)
N-(3-二甲氨基丙基)-N'-己基碳二亚胺盐酸	N-(3-Dimethylamino propyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$	191.70	$> 98\%$	Sigma-Aldrich 公司

硝酸	Nitric Acid	HNO_3	63.07	99.9%	Alfa Aesar
硝酸钠	Sodium Nitrate	$NaNO_3$	84.99	分析纯	广州化学试剂
硝酸汞	Mercury Nitrate	$Hg(NO_3)_2$	342.62	分析纯	广东陇西化工厂
N-羟基琥珀酰 亚胺	N-Hydroxy-succinimi de, NHS	$C_4H_5NO_3$	115.09	>98%	Sigma-Aldrich 公 司
兔肝金属硫蛋 白	Metallothioneins, MT	Zn_7 -MT	6000-700 0Da	$\geq 90\%$	湖南麓谷生物技 术有限公司
二氯甲基吡啶	Methyl viologen dichloride	$MVCl_2$	252.11	98%	Aldrich
L-甘氨酸	L-Glycine	$C_2H_5NO_2$	75.07	>99.0%	北京鼎国生物技 术有限责任公司
盐酸	Hydrochloric acid	HCl	36.46	36%, 优 级纯	Alfa Aesar
氯化汞	Mercuric chloride	$HgCl_2$	271.5	分析纯	广东陇西化工厂
浸镜油				折射率: 1.515	美国 Cargille Laboratories 公司
无水乙醇	Dehydrated Alcohol	CH_3CH_2OH	46.07	分析纯	湖南师范大学试 剂厂
去离子水	Deionized Water	H_2O	18.02	18.2 M Ω	经纯水仪制得
氩气	Argon	Ar	39.95	99.99%	长沙
氮气	Hydronitrogen	N_2	28.01	99.00%	长沙
氢气	Hydrogen	H_2	2.02	99.99%	长沙

3.2.2 实验仪器

实验所用仪器如表 3-2 所示:

表 3-2 实验仪器

Tab.3-2 Instruments

名称	型号	产地
定时恒温磁力搅拌 器	JB-3	上海雷磁新泾仪器有限公司
超声波清洗器	KQ-50B	昆山市超声仪器有限公司
扫描电化学显微镜	CHI900b	上海辰华仪器有限公司

超微圆盘金探针	直径 10 μm	上海辰华仪器有限公司
超微圆盘铂探针	直径 10 μm	上海辰华仪器有限公司
饱和 Ag/AgCl 电极		上海辰华仪器有限公司
铂丝电极		上海辰华仪器有限公司
溅射镀膜机	108auto	CRESSINGTOM
全自动交流稳压电源	TND-C3000	北京中科可来博电子技术有限公司
旋片真空泵	2XZ-4	浙江黄岩求精真空泵厂
真空电磁带空气阀	DDC-JQ25	北京中科科美真空技术有限责任公司
磨针仪	BV-10	Sutter Instrument Co.
倒角机	BV-10	Sutter Instrument Co.
pH 计	430	Laboration Equipment 公司
纯水系统	Simplicity185	Millipore S.A. France
电子分析天平	Sartorius BS210S	北京赛多利斯仪器系统有限公司
移液枪	Eppendorf Reference, 200 μl , 1000 μl	法国 Gilson 公司
紫外可见分光光度计	UV-2450	SHIMADZU(日本岛津)
台式冷冻离心机	Centrifuge 5417R	法国 Millipore 公司
表面等离子体激元共振仪	自组装	自组装

3.3 实验条件的优化

3.3.1 紫外-可见分光光度法实验条件的优化

1) 溶液中 apo-MT 的制备

本实验所用的脱金属硫蛋白 (apo-MT) 是通过冷冻离心机结合 Microcon YM-3 离心超滤膜分离 MT 而得到。实验中选取 Microcon YM-3 3 KDa 型号, 大于 3 KDa 的物质将留在膜的上方, 即上清液中, Zn-MT 中的 Zn 将沉积在下清液中。

首先调试好冷冻离心机为最佳分离条件, 取 300 μL MT 溶液于装有分离膜的离心管中进行分离, 第一次加入 HCl 溶液 (pH=2) 200 μL , 重复五次, 去除 MT 中金属离子, 得到 apo-MT。然后再向 apo-MT 中加入 HCl 溶液至总体积约 500 μL , 待用。其中所有的溶液都通 N_2 以除去溶液中的 O_2 。

2) 溶液中 apo-MT 的定量

DTNB 作为巯基试剂 (Ellman 氏试剂), 与硫醇存在如下反应:

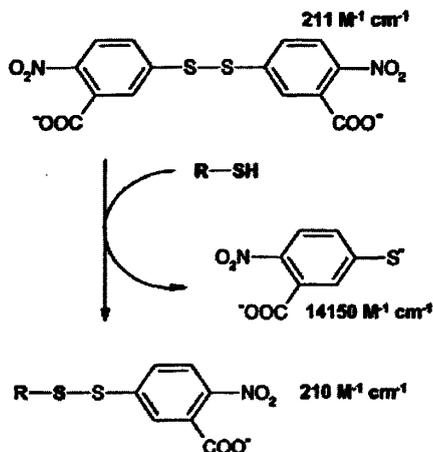


图 3-1 Ellman's 试剂与硫醇的反应示意图^[115], 其中 $pH > 7.3$, 产物 TNB^{2-} 在 412 nm 处有强烈的吸光效应

Fig.3-1 Reaction of a mercaptan with Ellman's reagent, yielding a mixed disulfide and one equivalent of TNB^{2-} . The molar absorptivities (ϵ_{412}) all refer to $pH > 7.3$ ^[115]

反应中 1 分子硫醇引起 1 分子硝基苯甲酸 (TNB^{2-}) 的释放, 后者在 412 nm 波长处有强烈的光吸收, 可利用此性质对通过绘制半胱氨酸溶液的浓度-吸光度标准曲线, 可以对溶液中的 MT 进行定量。

配一系列浓度的半胱氨酸溶液, 并分别加入过量的 DTNB, 调节 pH 值 > 7 , 待反应完全 (约 15 min) 后, 利用紫外-可见分光光度法进行检测 (扫描范围为 $190\sim 500\text{ nm}$)。在 412 nm 处测得吸光度值, 如表 3-3 所示:

表 3-3 不同巯基浓度与 DTNB 反应在 412 nm 处的吸光度值

Tab.3-3 Relationship between UV absorption and sulfhydryl of defferen kinds of concentration

$C_{SH}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0	9.6	18.5	34.5	48.4	60.6	71.4
吸光度 A	0.000	0.134	0.256	0.423	0.589	0.757	0.860

由表 3-3 数据得如下 $A \sim C_{SH}$ 巯基标准曲线 (如图 3-2):

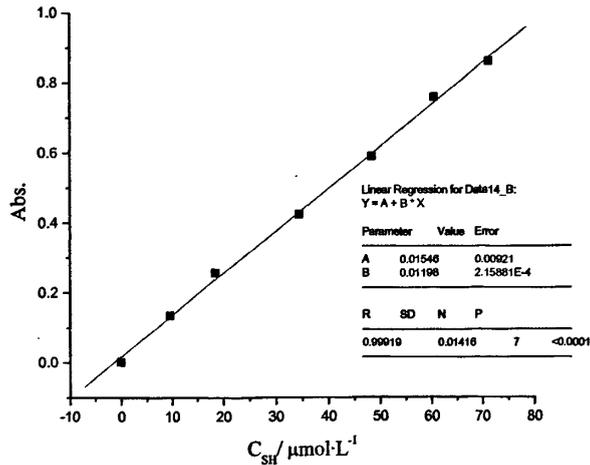


图 3-2 巯基浓度的标准曲线图

Fig.3-2 Standard curve of the concentration of sulfhydryl

在相同条件下将本实验所用 apo-MT 溶液与过量 DTNB 充分反应，测得吸光度值为 1.02（三次平行实验取均值），已知 1 mol apo-MT 含有 20 mol 半胱氨酸，则由标准曲线计算出本实验中 apo-MT 的浓度为 $216.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3.2 SECM-SPR 检测法试验条件优化

1) 汞溶液的选择

尽管在低 pH 值并有氯离子参与条件下， Hg^{2+} 与 MT 的结合能力十分突出^[94, 95]，但在电化学氧化汞至 Hg^{2+} 过程中，氯离子的加入极易促成 Hg^+ 产生，得到甘汞沉淀^[96, 97]，而使 Hg^{2+} 溶出过程很难定量。因此我们选用 $\text{HNO}_3 + \text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 溶液体系 ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Hg}(\text{NO}_3)_2 + 0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{HNO}_3$ 溶液， $\text{pH}=2$)。

2) 电极材料的选择

由于汞能与很多金属结合（汞齐化）而成汞齐。因此预沉积汞的电极材料将会影响汞在阳极的氧化溶出。

分别将金盘电极和铂盘电极置于 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 溶液 ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Hg}(\text{NO}_3)_2 + 0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{HNO}_3$ 溶液， $\text{pH}=2$) 中，在 -0.2 V 电位下沉积汞，将电极取出，用二次水冲洗干净，放入 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3 + \text{HNO}_3$ 溶液 ($\text{pH}=2$) 中，以线性扫描伏安法释放 Hg^{2+} 。

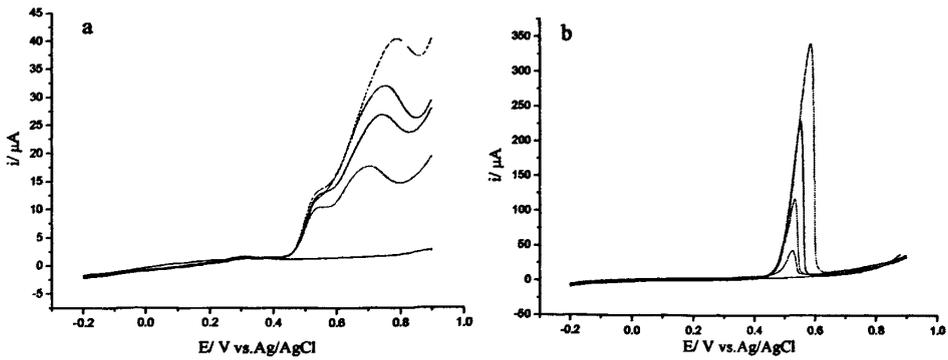


图 3-3 预沉积不同量汞的金盘电极 (a 图) 和铂盘电极 (b 图) 在 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaNO}_3 + \text{HNO}_3$ 溶液 ($\text{pH}=2$) 中的线性扫描曲线, 预沉积汞的量由下至上依次增大, 扫描速率为 $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Fig.3-3 Linear sweep voltammogram of gold (panel a) and platinum (panel b) electrode in $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaNO}_3 + \text{HNO}_3$ solution ($\text{pH}=2$), Hg predeposited on the electrodes are of increasing size from lower to upper, scanning rate is $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

比较图 3-3 中 a、b 两图可知, 与铂电极相比, 金电极与汞的汞齐化作用明显, 使汞在电极上的氧化溶出过程较为复杂, 这可能会使随后的 SECM-SPR 检测结果复杂化。因此, 选铂电极为工作电极。同时, 由于铂电极上汞的氧化很剧烈, 为避免汞的释放速率过快, 局部区域内汞离子浓度增幅过大, 而对 SPR 信号产生影响, 将扫速降为 $0.001 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

3) 铂探针的预沉积

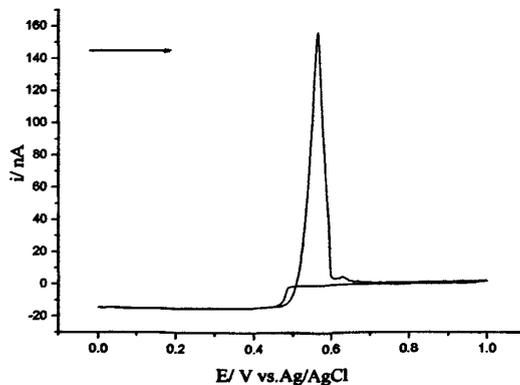


图 3-4 SECM 铂探针在 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中 ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Hg}(\text{NO}_3)_2 + 0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaNO}_3 + \text{HNO}_3$ 溶液, $\text{pH}=2$) 的循环伏安图, 扫描速率为 $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, 箭头表示扫描方向

Fig.3-4 cyclic voltammogram of SECM Pt tip in $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ solution ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Hg}(\text{NO}_3)_2 + 0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaNO}_3 + \text{HNO}_3$ solution, $\text{pH}=2$), scanning rate is $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, arrow shows the scanning direction

由Hg(NO₃)₂溶液 (5.0 mmol·L⁻¹ Hg(NO₃)₂ + 0.01 mol·L⁻¹ NaNO₃ + HNO₃溶液, pH=2) 的循环伏安曲线 (如图3-4), 确定汞的沉积电位 (-0.1 V), 汞氧化的峰电位为0.56 V, 则可以确定Hg²⁺溶出时线性扫描伏安法的电位扫描范围 (0.3~0.7 V)。

将直径为10 μm SECM铂探针置于Hg(NO₃)₂溶液 (5.0 mmol·L⁻¹ Hg(NO₃)₂ + 0.01 mol·L⁻¹ NaNO₃ + HNO₃溶液, pH=2) 中, 在-0.1 V电位下电化学沉积汞, 以沉积时间为变量。沉积汞后, 迅速将铂探针从Hg²⁺溶液中取出, 并浸入0.01 mol·L⁻¹ NaNO₃ + HNO₃溶液 (pH=2) 中以免探针上的汞与沉积溶液中的Hg²⁺发生歧化反应^[96]。



4) 探针向基底的逼近

固定加载了 SPR 基底的棱镜与聚四氟乙烯电解池^[12], 调整电解池和微电极探针位置, 使微电极探针处在激光光斑上方。然后向电解池中加入 1.0 mmol·L⁻¹ MVCl₂ + 10 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液, 通过控制 SECM 探针上 MV²⁺还原的反馈电流实现探针向基底表面逼近, 终点电流比率为 75%。当达到探针/基底的最适距离 (d~9 μm) 时, 将 MVCl₂ + NaCl 溶液用移液管移出, 冲洗电解池。

随后, 向电解池中注入 Gly-HCl (pH=2, Gly 100 mmol·L⁻¹) 缓冲溶液洗脱固定在 SPR 基底的 MT 分子中的金属离子。随后用去离子水冲洗电解池, 并注入 0.01 mol·L⁻¹ NaNO₃ + HNO₃ 溶液 (pH=2)。待状态稳定后, 采用线性扫描伏安技术在 SECM 探针上施加电位, 扫描范围为 (0.3~0.7 V), 扫速为 0.001 V·s⁻¹, 同时用 SPR 检测基底上共振角位移的变化。实验在室温下氮气氛围内完成。

3.4 结果与讨论

3.4.1 紫外-可见分光光度法检测 apo-MT 与 Hg²⁺ 的结合

依次取不同体积的 1.52 mmol·L⁻¹ 的 HgCl₂ 溶液加入 10 μL apo-MT 溶液中再定容至 200 μL, 得 Hg²⁺/apo-MT 分别为 1、3、5、7、10、15、18、19、20、40、60、80、100、120、130、160 的混合溶液, 10 min 后, 进行紫外-可见分光光度法检测 (如图 3-5、图 3-6)。

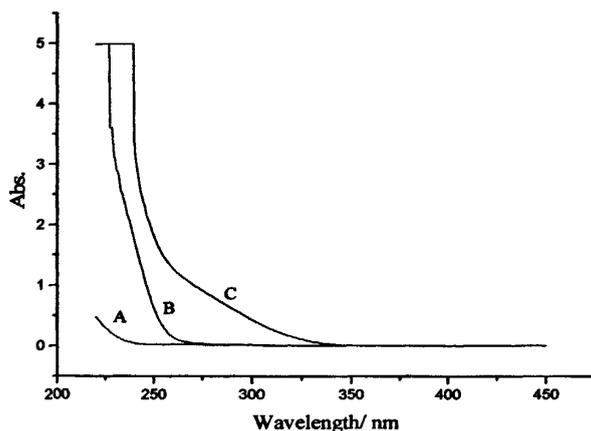


图 3-5 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合的紫外光谱图，图中，A、B、C 分别为 apo-MT 溶液、 HgCl_2 溶液和 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合的紫外吸收曲线，其中 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}} \approx 120$

Fig.3-5 UV absorption spectrum of Hg-MT, A, B, C correspond to apo-MT, HgCl_2 and Hg-MT, respectively

图 3-5 是 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合的紫外光谱图。可见，在 200~260 nm 波长范围内， Hg^{2+} 存在强烈的紫外吸收，而在 270~380 nm 波长范围内，apo-MT 与 Hg^{2+} 均没有特征吸收，Hg-MT 在 300 nm 附近显示出 Hg-S 键的特征吸收峰。我们选定此范围进行检测。

由图 3-6a、b 可见，当 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合数达到 7 之前，Hg-S 键的特征吸收峰在 310 nm 波长处，并随 Hg^{2+} 的量的增大而升高。但当 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}} \geq 10$ 时，在 310 nm 处已观察不到特征吸收峰，270~380 nm 波长范围内紫外信号已呈直线型。而文献数据（如图 3-6c），当 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}}$ 为 10 时，在 310 nm 处 Hg-S 键的特征吸收峰已不明显；当 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}}$ 为 14 时，难以分辨此处的吸收峰，紫外信号呈直线型。出现这种现象的原因可能是在 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}} \geq 10$ 时，MT 中 Hg-S 键由类四面体结构转变为平面三角型结构，并最终转变为对角型结构^[56, 89-93, 95, 101]，这一过程中，Hg-S 键的紫外特征吸收峰已经发生蓝移，而与 Hg^{2+} 的特征吸收峰发生重叠难以分离，或已经超出紫外可见光谱检测范围。

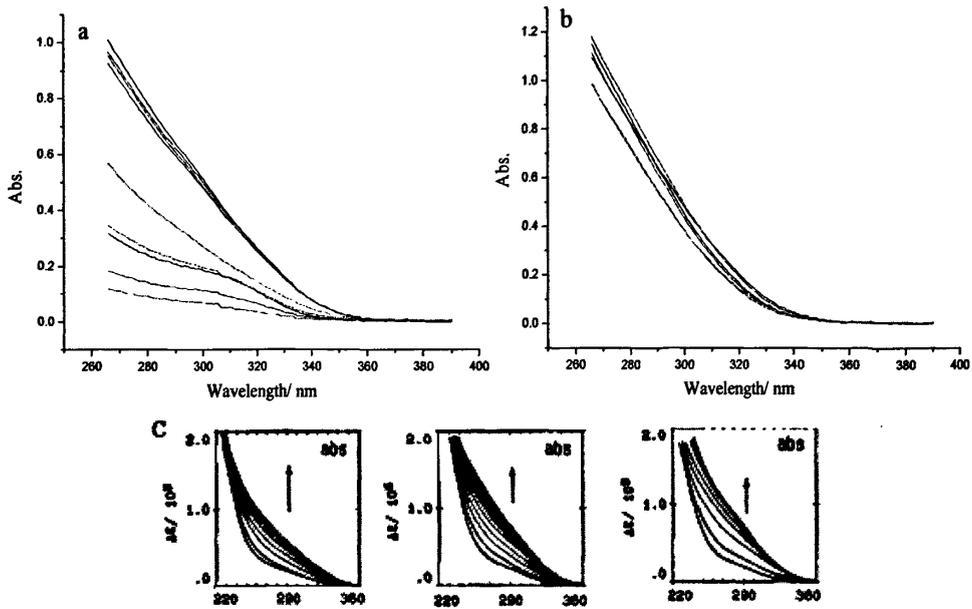


图 3-6 不同量的 Hg²⁺与 apo-MT 结合的紫外光谱图, 图 a 中, 由下至上, $n_{Hg^{2+}}/n_{apo-MT} \approx 1, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 19, 20$; 图 b 中, 由上至下, $n_{Hg^{2+}}/n_{apo-MT} \approx 40, 60, 100, 120, 130, 160$; 图 c 为文献资料^[90], 从左至右分别为兔肝 apo-MT 2、兔肝 apo-MT 1、鼠肝 apo-MT 1 与 10、11、12、13、14、15、16、17、18 倍 Hg²⁺结合的紫外光谱数据

Fig.3-6 UV absorption spectrum of Hg-MT, in panel a, from lower to upper, $n_{Hg^{2+}}/n_{apo-MT} \approx 1, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 19, 20$; in panel b, from upper to lower, $n_{Hg^{2+}}/n_{apo-MT} \approx 40, 60, 100, 120, 130, 160$; panel c is from ref.90, from left to right, the MTs used are rabbit apo-MT2, rabbit apo-MT1, rat apo-MT1, respectively, the amount of Hg²⁺ is 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 times of MT

可见, 应用传统的紫外可见光谱滴定法较适合检测小剂量 Hg²⁺与 apo-MT 的结合作用, 而在 Hg²⁺浓度较大时, 则存在一定的局限。

3.4.2 SECM-SPR 检测 apo-MT 与 Hg²⁺的结合

1) SECM-SPR 检测 MUA 基底上 Hg²⁺的释放

实验中, 先在仅组装了 MUA 的金膜上进行 Hg²⁺释放的 SECM-SPR 实验, 以获取对照实验数据。完成探针向 MUA SAM 基底的逼近后, 向电解池中加入 0.01 mol·L⁻¹ NaNO₃+HNO₃ 溶液 (pH=2), 当实验状态稳定, 即 SPR 基线平稳时, 利用线性伏安扫描法氧化溶出 Hg²⁺, 同时记录 SPR 共振角位移变化曲线 (如图 3-7), 对照实验条件为未沉积汞的探针在 MUA SAM 基底上的释放。

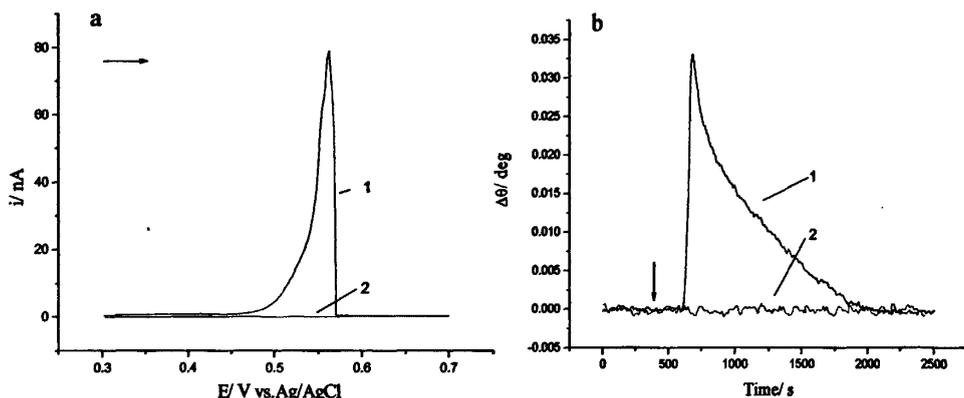


图 3-7 铂探针上汞的线性伏安扫描曲线 (a 图曲线 1) 和与之相应的 MUA SAM 基底上 SPR 共振角位移-时间图 (b 图曲线 1), 图 a、b 中曲线 2 为对照实验数据, 实验中 d 约为 $9\ \mu\text{m}$, 图 a 中扫速为 $0.001\ \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$, 箭头表示扫描方向, 图 b 中箭头表示此时探针上开始施加电位, Fig.3-7 Linear sweep voltammogram of Hg on Pt tip (curve 1 in panel a) and the corresponding SPR dip shift-time diagrams of MUA SAM substrate are shown as curve 1 in panel b, curves 2 in both panel are control experiment, $d \approx 9\ \mu\text{m}$, scanning rate is $0.001\ \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$, the arrow in panel a shows the scanning direction, the arrow in panel b indicates the start time of stripping

图 3-7 中, SPR 基线稳定后, 开始施加电位时 SPR 信号并不发生改变, 当电位升至约 $0.5\ \text{V}$ 时, 随着 Hg^{2+} 的溶出 SPR 信号开始增大。但是当汞完全溶出后, 基底的 SPR 信号达到峰值, 随后又慢慢回落到基线的位置, 并保持不变。

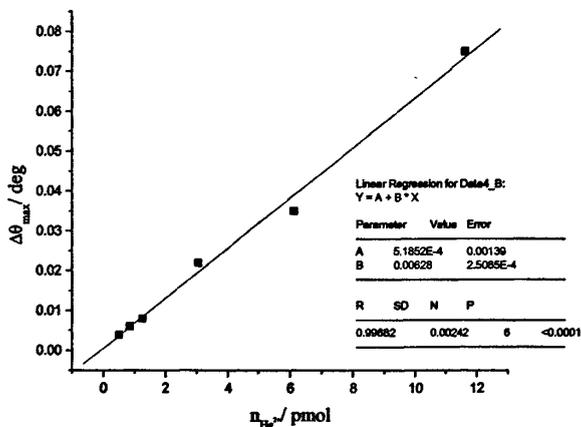


图 3-8 铂探针上溶出的 Hg^{2+} 的量与其在 MUA SAM 基底上产生的 SPR 信号峰值关系图, 插图为线性拟合信息, 实验中 d 约为 $9\ \mu\text{m}$

Fig.3-8 Relationship between the amount of Hg^{2+} stripping from the Pt tip and the SPR signal of MUA SAM substrate, insert is the information of the fitting curve, $d \approx 9\ \mu\text{m}$

探针上预沉积不同量的汞在 MUA SAM 基底上释放, 可得到一系列形状相似的 SPR 信号图, 并且 SPR 信号峰值的大小与汞的释放量存在以上线性关系。

可见, 在基底上, MUA SAM 对 Hg^{2+} 并没有吸附或结合作用。在 Hg^{2+} 溶出阶段, SPR 信号的增大是由于探针与基底间微区内 Hg^{2+} 的溶出速率大于 Hg^{2+} 向外扩散速率, 而使微区内 Hg^{2+} 浓度不断增大, 溶液折射率发生较大改变所致; 当汞完全氧化后, Hg^{2+} 的量不再增加, 而 Hg^{2+} 的向外扩散运动仍然继续, 微区内 Hg^{2+} 浓度开始慢慢减小, 使溶液折射率较之前发生相反变化, SPR 信号则逐渐减小, 直至扩散平衡。而对整个电解池 (容积约 1.5 mL) 内溶液而言, 探针上溶出的 Hg^{2+} 的量 (pmol 级) 所能引起的溶液折射率变化可以忽略不计, 则微区内外 Hg^{2+} 扩散平衡时, SPR 信号最终回落至原点。

2) SECM-SPR 检测 apo-MT 与 Hg^{2+} 的结合

实验时, 先在 SECM 探针上预沉积汞, 再进行 SECM-SPR 实验。在 d 距离处, 在探针上阳极氧化的汞离子迅速扩散到 SPR 基底, 并与 apo-MT 分子结合, 产生 MT 膜的折射率发生变化, 通过记录 SPR 共振角位移变化可以实现对 apo-MT 捕获 Hg^{2+} 过程的检测。

以上过程中, SECM 探针和 MT 覆盖的 SPR 基底上发生如下反应:



由于 Hg^{2+} 与 apo-MT 的结合能力很强, 反应 (3-1) 中生成的 Hg^{2+} 到达 SPR 基底后即与 apo-MT 结合 (如图 3-9)。

对照实验是未沉积汞的探针在 apo-MT 基底上进行线性扫描时测得的电化和 SPR 信号 (如图 3-9a、b 图中的曲线 2)。

对图 3-9a 进行积分, 得到此时探针上释放的 Hg^{2+} 约为 2.6 pmol, 则 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}}$ 约为 18, 此时, SPR 检测到 $\Delta\theta$ 约为 0.011° , 由于 MUA SAM 对 Hg^{2+} 并没有吸附或结合作用 (经 1) 部分内容论证), 则 $\Delta\theta$ 完全由 apo-MT 结合 Hg^{2+} 引起。但是, 同 apo-MT 与 Cu^{2+} 结合过程有所不同, 由于微区内瞬间 Hg^{2+} 的浓度增大引起的折射率变化掩盖了部分 apo-MT 与 Hg^{2+} 的结合信息, 我们无法检测到二者结合的动态过程。

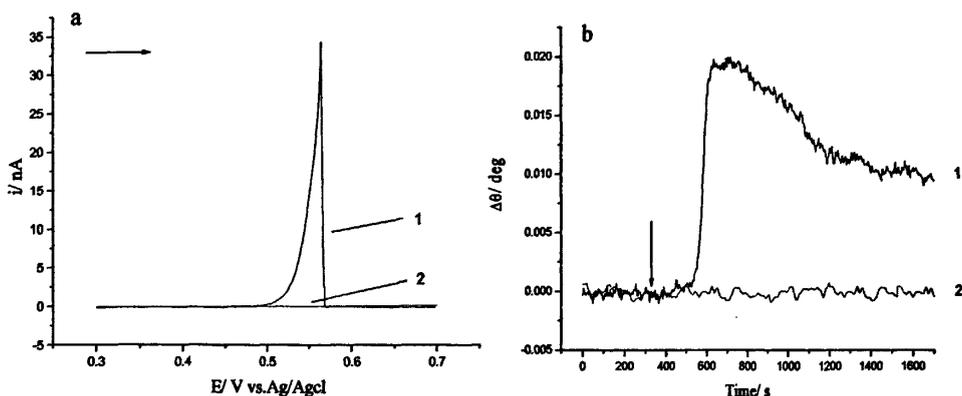


图 3-9 铂探针上汞的线性伏安扫描曲线 (a 图曲线 1) 和与之相应的 apo-MT 基底上 SPR 共振角位移-时间图 (b 图曲线 1), 图 a、b 中曲线 2 为对照实验数据, 实验中 d 约为 $9 \mu\text{m}$, 图 a 中扫速为 $0.001 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, 箭头表示扫描方向, 图 b 中箭头表示此时探针上开始施加电位

Fig.3-9 Linear sweep voltammogram of Hg on Pt tip (curve 1 in panel a) and the corresponding SPR dip shift-time diagrams of apo-MT substrate are shown as curve 1 in panel b, curves 2 in both panel are control experiment, $d \approx 9 \mu\text{m}$, scanning rate is $0.001 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, the arrow in panel a shows the scanning direction, the arrow in panel b indicates the start time of stripping

图 3-10 是采用原位多次释放 Hg^{2+} 的方法, 得到 apo-MT 累积结合 Hg^{2+} 的终态结构变化信息。可见, 在 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合数达到 8 时, MT 基底上产生了约为 0.007° 的 SPR 信号变化。在 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合数达到 18 之前, 探针上继续释放 Hg^{2+} , SPR 共振角位移逐渐增大, 但增大的幅度明显降低, 可推知, 此时 MT 与 Hg^{2+} 结合的键合情况已有所不同。当 apo-MT 与 Hg^{2+} 的结合数达到 18 时, SPR 共振角位移增加至 0.011° 。而继续释放小剂量的 Hg^{2+} 至微区内 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}}$ 约为 73 时, SPR 信号并不发生变化, 可见此时 MT 已达饱和状态, 构型稳定。而当微区内 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}}$ 已累积达到 120 时, SPR 信号大幅增大, SPR 信号在 0.040° 处保持稳定, 与 MT 的饱和结构相比较, 此时产生 $\Delta\theta$ 净变化约 0.028° 。可见, 此时基底上 MT 构型发生了剧烈的变化。

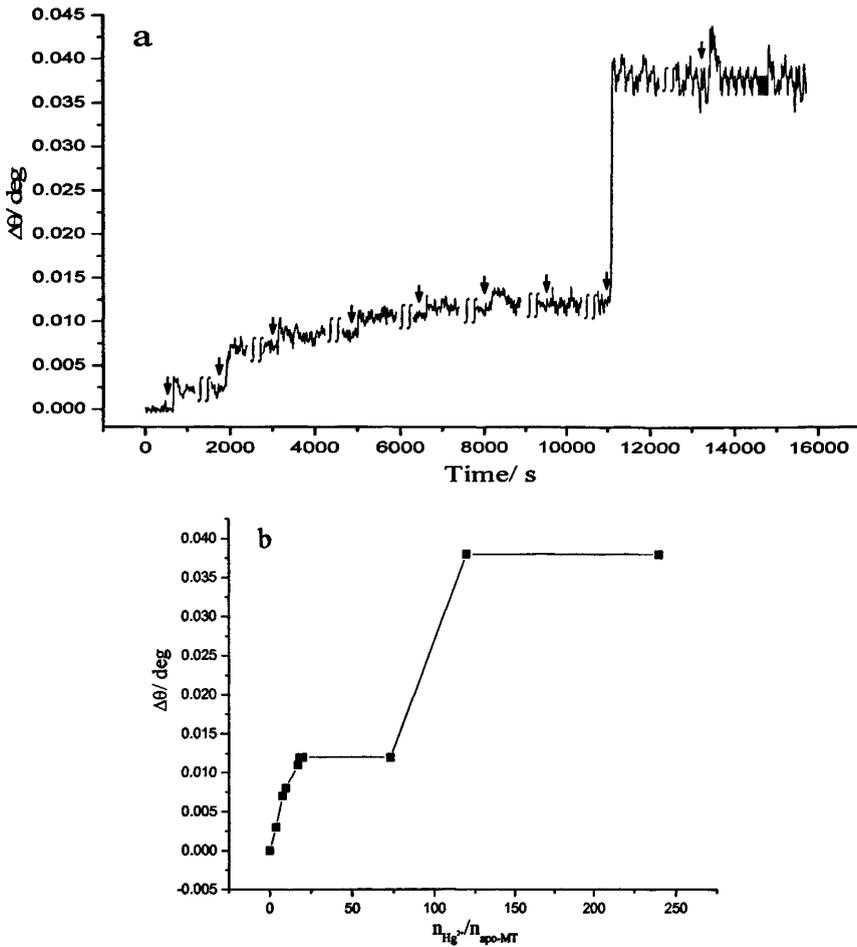


图 3-10 apo-MT 基底上原位多次释放 Hg^{2+} 得到的二者结合终态的 SPR 共振角位移-时间图(a) 和对应的 SPR 共振角位移- $n_{Hg^{2+}}/n_{apo-MT}$ 关系图 (b)，图 a 中，apo-MT 基底上累积释放 Hg^{2+} 数分别为 4、8、10、17、18、20、73、120、240 倍 apo-MT 的量，实验中 d 约为 $9\ \mu m$ ，

线性伏安扫描法的扫速为 $0.001\ V \cdot s^{-1}$ ，图中箭头表示探针上开始施加电位的时间

Fig.3-10 Relationship between SPR signal of apo-MT substrate and time when Hg^{2+} stripped in situ (panel a) and relationship between SPR signal and $n_{Hg^{2+}}/n_{apo-MT}$ (panel b), in panel a, the amount of Hg^{2+} accumulated is 4, 8, 10, 17, 18, 20, 73, 120, 240 times of the amount of apo-MT, respectively, $d \approx 9\ \mu m$, scanning rate is $0.001\ V \cdot s^{-1}$, arrows show the start stripping time

在最后一次原位释放 Hg^{2+} （此次释放中 $n_{Hg^{2+}}/n_{apo-MT}$ 约为 120）过程中，发现基底上 SPR 信号出现三角峰，即 SPR 共振角位移变化仅体现微区内 Hg^{2+} 溶出和扩散过程的信息，而 SPR 信号稳定后，释放前后 $\Delta\theta$ 保持不变（见图 3-11）。

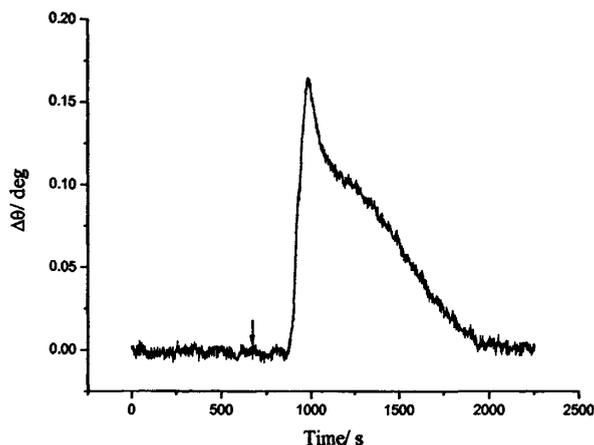


图 3-11 apo-MT 基底上原位释放 Hg^{2+} 达的 120 倍 apo-MT 的量后, 继续释放 Hg^{2+} 产生 SPR 共振角位移-时间图, 本次释放 Hg^{2+} 达的 120 倍 apo-MT 的量, 实验中 d 约为 $9\ \mu\text{m}$, 线性伏安扫描法的扫速为 $0.001\ \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$, 图中箭头表示探针上开始施加电位的时间

Fig.3-11 Relationship between SPR signal of MT substrate and time when Hg^{2+} stripped in situ, the amount of Hg^{2+} has been stripped is 120 times of the amount of apo-MT, and the amount of Hg^{2+} this time is 120 times of the amount of apo-MT also, $d \approx 9\ \mu\text{m}$, scanning rate is $0.001\ \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$, arrows show the start time of stripping

已知 MT 的等电点 $\text{pH}=3.9\sim 4.6$, 在 $\text{pH}=2$ 时, MT 带有少量正电荷。在 MT-Hg 结合数少于 18 时, 由于 MT 上的巯基对 Hg^{2+} 有较强的结合能力, Hg^{2+} 优先与巯基活性位点相结合。当 MT 达到饱和后, 巯基不再结合 Hg^{2+} , 并且由于 MT 带有部分正电荷, 对金属离子存在一定的静电排斥作用, 周围环境中存在的少量的游离 Hg^{2+} 不易与 MT 上的其他活性位点 (如氨基) [98-100] 结合, 因此对 MT 尚不构成毒性伤害。但是当 Hg^{2+} 浓度达到 100 倍 MT 浓度时, 大量的 Hg^{2+} 将 MT 包围其中, 增大了 Hg^{2+} 与 MT 中的其他活性位点接触的机会, 而易于发生结合作用, 从而使 MT 的结构开始松散, 其稳定性变差, 并最终结构坍塌, 发生不可逆变性。

3.5 小结

通过紫外光谱滴定法研究 apo-MT 与 Hg^{2+} 的结合的实验数据, 以及参阅文献数据可知, 传统的紫外光谱滴定法较适用于 apo-MT 与小剂量 Hg^{2+} 的结合作用研究, Hg^{2+} 浓度较大时, 则存在一定的局限。

SECM-SPR 实验中, 我们发现汞离子溶出过程会引起溶液折射率发生较大的

变化, 产生较大的 SPR 信号掩盖了 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合的动态过程。但是在原位多次释放 Hg^{2+} 检测中, 我们得到 apo-MT 累积结合 Hg^{2+} 的结构变化信息。在 apo-MT 与 Hg^{2+} 结合数达到 18 时, MT 即达饱和状态, 共产生 0.011° 结构变化。

而当微区内 $n_{\text{Hg}^{2+}}/n_{\text{apo-MT}}$ 累积达 120 时, SPR 信号陡增至 0.040° , 此时基底上 MT 结构坍塌, 发生变性。

比较本实验所用两种方法可以得出, SECM-SPR 联用技术在研究生物分子与金属离子相互作用方面有着明显的优越性。

第四章 结论

本研究建立了 SECM-SPR 联用技术实时检测表面固定的硫蛋白与铜离子相互作用模型。拓展了 SECM-SPR 联用技术在无电化学活性生物分子的键合和解离反应领域的应用。

实验中得出结论，应用 SECM-SPR 技术研究金属蛋白质与金属离子相互作用，不但可以对作用过程进行实时在线的快速动力学研究，还可以避免传统光谱滴定法的某些固有局限，如光源的波长范围、实验体系中参与反应物质产生的光信号干扰等。

参考文献

- [1] Cliffel, D.E., A.J. Bard. Scanning Electrochemical Microscopy. 36. A Combined Scanning Electrochemical Microscope-Quartz Crystal Microbalance Instrument for Studying Thin Films. *Anal. Chem*, 1998, 70(9): 1993-1998.
- [2] Fan, F.R.F., D. Cliffel, A.J. Bard. Scanning Electrochemical Microscopy. 37. light emission by electrogenerated chemiluminescence at secm tips and their application to scanning optical microscopy. *Anal. Chem*, 1998, 70(14): 2941-2948.
- [3] Gollas, B., P.N. Bartlett, G. Denuault. An Instrument for Simultaneous Eqcm impedance and SECM Measurements. *Anal. Chem*, 2000, 72(2): 349-356.
- [4] Hillier, A.C., M.D. Ward. Scanning Electrochemical Mass Sensitivity Mapping of the Quartz Crystal Microbalance in Liquid Media. *Anal. Chem*, 1992, 64(21): 2539-2554.
- [5] Lee, Y., A.J. Bard. Fabrication and Characterization of Probes for Combined Scanning Electrochemical/optical Microscopy Experiments. *Anal. Chem*, 2002, 74(15): 3626-3633.
- [6] Macpherson, J.V., P.R. Unwin. Combined Scanning Electrochemical-Atomic Force Microscopy. *Anal. Chem*, 2000, 72(2): 276-285.
- [7] Szunerits, S., Knorr, N., Calemczuk, R., et al.. New Approach to Writing and Simultaneous Reading of Micropatterns: Combining Surface Plasmon Resonance Imaging with Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). *Langmuir*, 2004, 20(21): 9236-9241.
- [8] Tsionsky, M., Zhou, J., Amemiya, S., et al.. Scanning Electrochemical Microscopy. 38. Application of SECM to the study of charge transfer through bilayer lipid membranes. *Anal. Chem*, 1999, 71(19): 4300-4305.
- [9] Wei, C., Bard, A. J., Nagy, G., et al.. Scanning Electrochemical Microscopy. 28. Ion-selective neutral carrier-based microelectrode potentiometry. *Anal. Chem*, 1995, 67(8): 1346-1356.
- [10] James, P., N. Casillas, W.H. Smyrl. Simultaneous Scanning Electrochemical and Photoelectrochemical Microscopy by Use of A Metallized Optical Fiber. *J.electrochem.soc.*, 1996, 143(12): 3853-3865.
- [11] Treutler, T.H., G. Wittstock. Combination of An Electrochemical Tunneling

- Microscope (ECSTM) and A Scanning Electrochemical Microscope (SECM): Application for Tip-induced Modification of Self-assembled Monolayers. *Electrochim. Acta*, 2003, 48(20-22): 2923-2932.
- [12] Xiang, J., J. Guo, F.M. Zhou. Scanning Electrochemical Microscopy Combined with Surface Plasmon Resonance: Studies of Localized Film Thickness Variations and Molecular Conformation Changes. *Analy. Chem*, 2006, 78(5): 1418-1424.
- [13] Song, F., Zhou, F., Wang, J., et al.. Detection of Oligonucleotide Hybridization at Femtomolar Level and Sequence-Specific Gene Analysis of the Arabidopsis Thaliana Leaf Extract with An Ultrasensitive Surface Plasmon Resonance Spectrometer. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(14): e72.
- [14] Goodrich, T.T., H.J. Lee, R.M. Corn. Direct Detection of Genomic DNA by Enzymatically Amplified SPR Imaging Measurements of RNA Microarrays. *J. Amer. Chem. Soc.*, 2004, 126(13): 4086-4087.
- [15] Yu, F., Persson, B., Lofas, S., et al.. Attomolar Sensitivity in Bioassays Based on Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy. *J. Amer. Chem. Soc.*, 2004, 126(29): 8902-8903.
- [16] Bailey, L.E., Kambhampati, D., Kanazawa, K., et al.. Using Surface Plasmon Resonance and the Quartz Crystal Microbalance to Monitor in Situ the Interfacial Behavior of Thin Organic Films. *Langmuir*, 2002, 18(2): 479-489.
- [17] Baba, A., Lubben, J., Tamada, K., et al.. Optical Properties of Ultrathin Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Films at Several Doping Levels Studied by In Situ Electrochemical Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Langmuir*, 2003, 19(21): 9058-9064.
- [18] Nedelkov, D.. Development of Surface Plasmon Resonance Mass Spectrometry Array Platform. *Anal. Chem*, 2007, 79(15): 5987-5990.
- [19] Gordon, J.G., S. Ernst. Surface Plasmons as a Probe of the Electrochemical Interface. *Surf. Sci.*, 1980, 101(1-3): 499-506.
- [20] Iwasaki, Y., Horiuchi, T., Morita, M., et al.. Time Differential Surface Plasmon Resonance Measurements Applied for Electrochemical Analysis. *Electroanalysis*, 1997, 9(16): 1239-1241.
- [21] Baba, A., W. Knoll. Electrochemical Growth of Dendritic Conducting Polymer Networks. *Adv. Mater.*, 2003, 15(12): 1015-1019.
- [22] Jin, Y., Kang, X., Song, Y., et al.. Controlled Nucleation and Growth of Surface-Confined Gold Nanoparticles on a (3-aminopropyl) Trimethoxysilane-Modified Glass Slide: A Strategy for SPR Substrates. *Anal. Chem*, 2001, 73(13): 2843-2849.
- [23] Kang, X., G. Cheng, S. Dong. A Novel Electrochemical SPR Biosensor.

- Electrochem. Commun., 2001, 3(9): 489-493.
- [24] Kang, X., Jin, Y., Cheng, G., et al.. In Situ Analysis of Electropolymerization of Aniline by Combined Electrochemistry and Surface Plasmon Resonance. *Langmuir*, 2002, 18(5): 1713-1718.
- [25] Kang, X., Jin, Y., Cheng, G., et al.. Surface Plasmon Resonance Studies on the Electrochemical Doping/Dedoping Processes of Anions on Polyaniline-Modified Electrode. *Langmuir*, 2002, 18(26): 10305-10310.
- [26] Shao, Y., Jin, Y., Sun, X., et al.. A Method for Cathodic Polymerization of Aniline by In Situ Electrogenerated Intermediate at Gold Surface. *Thin Solid Films*, 2004, 458(1-2): 47-51.
- [27] Wang, F., Li, D., Li, G., et al.. Electrodissolution of Inorganic Ions/DNA Multilayer Film for Tunable DNA Release. *Biomacromolecules*, 2008, 9(10): 2645-2652.
- [28] Wang, J., et al.. Surface Plasmon Resonance and Electrochemistry for Detection of Small Molecules Using Catalyzed Deposition of Metal Ions on Gold Substrate. *Electrochemistry Communications*, 2007, 9(2): 343-347.
- [29] Wang, J., Wang, F., Xu, Z., et al.. Surface Plasmon Resonance and Electrochemistry Characterization of Layer-by-Layer Self-Assembled DNA and Zr^{4+} Thin Films, and Their Interaction with Cytochrome c. *Talanta*, 2007, 74(1): 104-109.
- [30] Iwasaki, Y., Horiuchi, T., Morita, M., et al.. Analysis of Electrochemical Processes Using Surface Plasmon Resonance. *Sens. Actuators, B: Chemical*, 1998, 50(2): 145-148.
- [31] Iwasaki, Y., Horiuchi, T., Morita, M., et al.. Electrochemical Reaction of $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ on Gold Electrodes Analyzed by Surface Plasmon Resonance. *Surf. Sci.*, 1999, 427-428: 195-198.
- [32] Iwasaki, Y., T. Horiuchi, O. Niwa. Detection of Electrochemical Enzymatic Reactions by Surface Plasmon Resonance Measurement. *Anal. Chem.*, 2001, 73(7): 1595-1598.
- [33] Baba, A., Park, M., Advincula, C., et al.. Simultaneous Surface Plasmon Optical and Electrochemical Investigation of Layer-by-Layer Self-Assembled Conducting Ultrathin Polymer Films. *Langmuir*, 2002, 18(12): 4648-4652.
- [34] Gu, H., Ng, Z., Deivaraj, T., et al.. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Electrochemistry Study of 4-Nitro-1,2-phenylenediamine: A Switchable Redox Polymer with Nitro Functional Groups. *Langmuir*, 2006, 22(8): 3929-3935.

- [35] Wang, Y., W. Knoll. In Situ Electrochemical and Surface Plasmon Resonance (SPR) Studies of Aniline-Carboxylated Aniline Copolymers. *Anal. Chim. Acta*, 2006, 558(1-2): 150-157.
- [36] Taranekar, P., Fulghum, T., Baba, A., et al.. Quantitative Electrochemical and Electrochromic Behavior of Terthiophene and Carbazole Containing Conjugated Polymer Network Film Precursors: EC-QCM and EC-SPR. *Langmuir*, 2007, 23(2): 908-917.
- [37] Schlereth, D.D., R.P.H. Kooyman. Self-Assembled Monolayers with Biospecific Affinity for NAD(H)-Dependent Dehydrogenases: Characterization by Surface Plasmon Resonance Combined with Electrochemistry 'in situ'. *J. Electroanal. Chem.*, 1998, 444(2): 231-240.
- [38] Tian, S., Baba, A., Liu, J., et al.. Electroactivity of Polyaniline Multilayer Films in Neutral Solution and Their Electrocatalyzed Oxidation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *Adv. Funct. Mater.*, 2003, 13(6): 473-479.
- [39] Simonian, A.L., Revzin, A., Wild, J. R., et al.. Characterization of Oxidoreductase-Redox Polymer Electrostatic Film Assembly on Gold by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Fourier Transform Infrared-External Reflection Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 466(2): 201-212.
- [40] Tang, H., Wang, Q., Xie, Q., et al.. Enzymatically Biocatalytic Precipitates Amplified Antibody-Antigen Interaction for Super Low Level Immunoassay: An Investigation Combined Surface Plasmon Resonance with Electrochemistry. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 23(5): 668-674.
- [41] Dijkstra, M., Kamp, B., Hoogvliet, J.C., et al.. Development of an Electrochemical Immunosensor for Direct Detection of Interferon at the Attomolar Level. *Anal. Chem.*, 2001, 73(5): 901-907.
- [42] 于萍, 齐斌, 崔小强, 等. 铁蛋白在修饰金电极上的直接电化学研究. *分析化学*, 2005, 33(9): 1239-1242.
- [43] Raitman, O.A., Katz, E., Buckmann, A.F., et al.. Integration of Polyaniline/Poly(acrylic acid) Films and Redox Enzymes on Electrode Supports: An in Situ Electrochemical/Surface Plasmon Resonance Study of the Bioelectrocatalyzed Oxidation of Glucose or Lactate in the Integrated Bioelectrocatalytic Systems. *J. Amer. Chem. Soc.*, 2002, 124(22): 6487-6496.
- [44] Liu, J., Tian, S., Tiefenauer, L., et al.. Simultaneously Amplified Electrochemical and Surface Plasmon Optical Detection of DNA Hybridization

- Based on Ferrocene-Streptavidin Conjugates. *Anal. Chem.*, 2005, 77(9): 2756-2761.
- [45] Ling, X.Y., D.N. Reinhoudt, J. Huskens. Reversible Attachment of Nanostructures at Molecular Printboards through Supramolecular Glue. *Chem. Mater.*, 2008, 20(11): 3574-3578.
- [46] Hiep, H.M., Endo, T., Saito, M., et al.. Label-Free Detection of Melittin Binding to a Membrane Using Electrochemical-Localized Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.*, 2008, 80(6): 1859-1864.
- [47] Fortin, E., Defontaine, Y., Mailley, P., et al.. Micro-imprinting of Oligonucleotides and Oligonucleotide Gradients on Gold Surfaces: A new Approach Based on the Combination of Scanning Electrochemical Microscopy and Surface Plasmon Resonance Imaging (SECM/SPR-i). *Electroanalysis*, 2005, 17(5-6): 495-503.
- [48] Sun, P., F.O. Laforge, M.V. Mirkin. Scanning Electrochemical Microscopy in the 21st Century. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, 9(7): 802-823.
- [49] Homola, J., S.S. Yee, G. Gauglitz. Surface Plasmon Resonance Sensors: review. *Sens. Actuators, B: Chemical*, 1999, 54(1-2): 3-15.
- [50] Raether, H.. Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings, Vol. 111 of Springer Tracts in Modern Physics. 1988, Springer-Verlag, Berlin.
- [51] Kagi, J.H.R., Y. Kojima. *Metallothionein II*. 1987, Basel: Birkhauser Verlag.
- [52] Fowler, B.A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y., et al.. Nomenclature of Metallothionein. *Experientia Suppl.*, 1987, 52: 19-22.
- [53] Kagi, J.H. Y. Kojima. Nomenclature of Metallothionein: a Proposal. *Experientia Suppl.*, 1979, 34: 141-142.
- [54] Winge, D.R. K.A. Miklossy. Domain Nature of Metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(7): 3471-3476.
- [55] Chan, J., Huang, Z., Merrifield, M.E., et al.. Studies of Metal Binding Reactions in Metallothioneins by Spectroscopic, Molecular Biology, and Molecular Modeling Techniques. *Coord. Chem. Rev.*, 2002, 233-234: 319-339.
- [56] Stillman, M.J.. Metallothioneins. *Coord. Chem. Rev.*, 1995, 144: 461-511.
- [57] Vasak, M.. Metal Removal and Substitution in Vertebrate and Invertebrate Metallothioneins. *Methods Enzymol.*, 1991, 205: 452-458.
- [58] Schweitzer-Stenner, R.. Advances in Vibrational Spectroscopy as a Sensitive Probe of Peptide and Protein Structure: A Critical Review. *Vib. Spectrosc.*, 2006, 42(1): 98-117.
- [59] Bulheller, B.M., A. Rodger, J.D. Hirst. Circular and Linear Dichroism of

- Proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, 9(17): 2020-2035.
- [60] Domon, B., R. Aebersold. *Mass Spectrometry and Protein Analysis*. Science, 2006, 312(5771): 212-217.
- [61] Mittermaier, A., L.E. Kay. *New Tools Provide New Insights in NMR Studies of Protein Dynamics*. Science, 2006, 312(5771): 224-228.
- [62] Schotte, F., Lim, M., Jackson, T. A., et al.. *Watching a Protein as it Functions with 150-ps Time-Resolved X-ray Crystallography*. Science, 2003, 300(5627): 1944-1947.
- [63] Kagi, J.H.R., A. Schaffer. *Biochemistry of Metallothionein*. *Biochemistry*, 1988, 27(23): 8509-8515.
- [64] Hamer, D.H.. *Metallothionein*. *Annu. Rev. Biochem*, 1986, 55: 913-951.
- [65] Mason, Z.A., K.D. Jenkins. *Metal Detoxification in Aquatic Organisms*, ed. A. Tessier and D.R. Turner. 1995, New York: John Wiley & Sons.
- [66] Fischer, E.H., E.W. Davie. *Recent Excitement Regarding Metallothionein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(7): 3333-3334.
- [67] Presta, A., D.A. Fowle, M.J. Stillman. *Structural Model of Rabbit Liver Copper Metallothionein*. *J. Chem. Soc., Dalton Transactions*, 1997, 1997(6): 977-984.
- [68] Nielson, K.B., C.L. Atkin, D.R. Winge. *Distinct Metal-binding Configurations in Metallothionein*. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260(9): 5342-5350.
- [69] 王夔. *生物无机化学*. 1988, 北京: 清华大学出版社.
- [70] Cano-Gauci, D.F., B. Sarkar. *Reversible Zinc Exchange between Metallothionein and the Estrogen Receptor Zinc Finger*. *FEBS Lett.*, 1996, 386(1): 1-4.
- [71] Muñoz, J., Baena, J. R., Gallego, M., et al.. *Development of a Method for the Determination of Inorganic Cadmium and Cadmium Metallothioneins in Fish Liver by Continuous Preconcentration on Fullerene and Flame Atomic Absorption Spectrometry*. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17(7): 716-720.
- [72] Chen, P., Munoz, A., Nettekheim, D., et al.. *Stoichiometry and Cluster Specificity of Copper Binding to Metallothionein: Homogeneous Metal Clusters*. *Biochem. J*, 1996, 317: 395-402.
- [73] Suzuki, K. T., T. Maitani. *Metal-dependent Properties of Metallothionein Replacement In vitro of Zinc in Zinc-Thionein with Copper*. *Biochem. J*, 1981, 199(2): 289-295.
- [74] Vaher, M., Romero-Isart, N., Vasak, M., et al.. *Reactivity of Cd-7-Metallothionein with Cu(II) ions: Evidence for a Cooperative Formation of Cd-3,Cu(I)(5)-Metallothionein*. *J. Inorg. Biochem.*, 2001, 83(1): 1-6.

- [75] Wang, S., Boussaad, S., Wong, S., et al.. High-Sensitivity Stark Spectroscopy Obtained by Surface Plasmon Resonance Measurement. *Anal. Chem.*, 2000, 72(17): 4003-4008.
- [76] Yao, X., Wang, J., Zhou, F., et al.. Quantification of Redox-Induced Thickness Changes of 11-Ferrocenylundecanethiol Self-Assembled Monolayers by Electrochemical Surface Plasmon Resonance. *J. Phys. Chem. B.*, 2004, 108(22): 7206-7212.
- [77] Kolomenskii, A.A., P.D. Gershon, H.A. Schuessler. Sensitivity and Detection Limit of Concentration and Adsorption Measurements by Laser-Induced Surface-Plasmon Resonance. *Appl Opt.*, 1997, 36(25): 6539-47.
- [78] Lahiri, J., Isaacs, L., Grzybowski, B., et al.. Biospecific Binding of Carbonic Anhydrase to Mixed SAMS Presenting Benzenesulfonamide Ligands: a Model System for Studying Lateral Steric Effects. *Langmuir*, 1999, 15: 7186-7198.
- [79] Bontidean, I., Berggren, C., Johansson, G., et al.. Detection of Heavy Metal ions at Femtomolar Levels Using Protein-Based Biosensors. *Anal. Chem.*, 1998, 70(19): 4162-4169.
- [80] Burns, N.L., J.C. Clunie, J.K. Baird. Diaphragm Cell Determination of the Interdiffusion Coefficients for Aqueous Solutions of Copper Sulfate, Cobalt Sulfate, and Nickel Sulfamate. *J. Phys. Chem.*, 1991, 95(9): 3801-3804.
- [81] Bard, A.J., M.V. Mirkin. *Scanning Electrochemical Microscopy*. 2001, New York CRC Press.
- [82] Skoog, D.A., F.J. Holler, S.R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis* 6th ed., Thomson Brooks. 2007, Cole Publishing, Belmont, CA.
- [83] Rigby, K.E., M.J. Stillman. Structural Studies of Metal-free Metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 325(4): 1271-1278.
- [84] Maret, W.. Metallothionein Disulfide Interactions, Oxidative Distress, and the Mobilization of Cellular Zinc. *Neurochem. Int.*, 1995, 27(1): 111-117.
- [85] Jimenez, O.A., Chikneyan, S., Baca, A.J., et al.. Sensitive Detection of Sulfhydryl Groups in Surface-Confined Metallothioneins and Related Species via Ferrocene-Capped Gold Nanoparticle/Streptavidin Conjugates. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39(5): 1209-1213.
- [86] Bremner, I. Involvement of Metallothionein in the Hepatic Metabolism of Copper. *J. Nutr.*, 1987, 117(1): 19.
- [87] 郑徽, 金银龙. 汞的毒性效应及作用机制研究进展. *卫生研究*, 2006, 35(5): 663-666.
- [88] 黄锋, 张宏. 汞的生物毒性及其防治策略. *阜阳师范学院学报, 自然科学版*, 2002, 19(003): 29-30.
- [89] Vasak, M., J.H.R. Kaegi, H.A.O. Hill. Zinc(II), Cadmium(II), and Mercury(II)

- Thiolate Transitions in Metallothionein. *Biochemistry*, 1981, 20(10): 2852-2856.
- [90] Lu, W., A.J. Zelazowski, M.J. Stillman. Mercury Binding to Metallothioneins: Formation of the Hg₁₈-MT Species. *Inorg. Chem.*, 1993, 32(6): 919-926.
- [91] Jiang, D.T., Heald, S.M., Sham, T.K., et al.. Structures of the Cadmium, Mercury, and Zinc Thiolate Clusters in Metallothionein: XAFS Study of Zn₇-MT, Cd₇-MT, Hg₇-MT, and Hg₁₈-MT Formed from Rabbit Liver Metallothionein 2. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1994, 116(24): 11004-11013.
- [92] Charnock, J.M., Garner, C.D., Abrahams, I.L., et al.. EXAFS Studies of Metallothionein. *Phys. Rev. B: Condens. Matter*, 1989, 158(1-3): 93-94.
- [93] Lu, W., M.J. Stillman. Mercury-Thiolate Clusters in Metallothionein. Analysis of Circular Dichroism Spectra of Complexes Formed between Alpha-Metallothionein, Apometallothionein, Zinc Metallothionein, and Cadmium Metallothionein and Mercury²⁺. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1993, 115(8): 3291-3299.
- [94] Jocelyn, P.C.. *Biochemistry of the SH Group: the Occurrence, Chemical Properties, Metabolism and Biological Function of Thiols and Disulphides*. 1972, London & New York: Academic Press.
- [95] Leiva-Presa, A., M. Capdevila, P. Gonzalez-Duarte. Mercury(II) Binding to Metallothioneins - Variables Governing the Formation and Structural Features of the Mammalian Hg-MT Species. *Eur. J. Biochem.*, 2004, 271(23-24): 4872-4880.
- [96] Jagner, D., E. Sahlin, L. Renman. Apparent Formation of an Oxidant by Electrochemical Reduction in the Mercury(0,I,II) Chloride System. *Anal. Chem.*, 1996, 68(9): 1616-1622.
- [97] Nolan, M.A., S.P. Kounaves. Effects of Chloride Ion Concentration on Mercury(I) Chloride Formation during ex Situ and in Situ Mercury Deposition with Selected Electrode Substrates and Electrolytes. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 1176-1182.
- [98] Tanaka, Y., Oda, S., Yamaguchi, H., et al.. Structural Analyses on the Mercury(II)-Mediated T-T Base Pair. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2006, (50): 47-8.
- [99] Tanaka, Y., Oda, S., Yamaguchi, H. et al.. Structural and Physicochemical Features on the Metal-Mediated Base Pairs. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2007,(51): 75-6.
- [100] Johannsen, S., Paulus, S., Dupre, N., et al.. Using in Vitro Transcription to Construct Scaffolds for One-Dimensional Arrays of Mercuric Ions. *J. Inorg.*

- Biochem., 2008, 102(5-6): 1141-1151.
- [101] Stillman, M.J., Donald T., Colleen T., et al.. Circular Dichroism, Kinetic and Mass Spectrometric Studies of Copper(I) and Mercury(II) Binding to Metallothionein. *J. Inorg. Biochem.*, 2000, 79: 11-19.
- [102] Kittle, C.. *Solid State Physics*. 1996, New York: John Wiley & Sons.
- [103] Boussaad, S., J. Pean, N.J. Tao. High-Resolution Multiwavelength Surface Plasmon Resonance Spectroscopy for Probing Conformational and Electronic Changes in Redox Proteins. *Anal. Chem*, 2000, 72(1): 222-226.
- [104] Shao, Y., Jin, Y., Wang, J., et al.. Conducting Polymer Polypyrrole Supported Bilayer Lipid Membranes. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20(7): 1373-1379.
- [105] Baba, A., R.C. Advincula, W. Knoll. In Situ Investigations on the Electrochemical Polymerization and Properties of Polyaniline Thin Films by Surface Plasmon Optical Techniques. *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106(7): 1581-1587.
- [106] Prinz, R., U. Weser. A Naturally Occurring Cu-thionein in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1975, 356(6): 767-776.
- [107] 周妍娇, 茹炳根. 金属硫蛋白 α 和 β 结构域的结构功能比较研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(005): 772-778.
- [108] Kameo, S., Nakai, K., Kurokawa, N., et al.. Metal Components Analysis of Metallothionein-III in the Brain Sections of Metallothionein-I and Metallothionein-II Null Mice Exposed to Mercury Vapor with HPLC/ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem*, 2005, 381(8): 1514-1519.
- [109] 田晓丽, 郭军华. 金属硫蛋白的研究进展. *国外医学: 药学分册*, 2005, 32(002): 119-124.
- [110] Robbins, A.H., McRee, D.E., Williamson, M., et al.. Refined Crystal-Structure of Cd, Zn Metallothionein at 2.0 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 1991, 221(4): 1269-1293.
- [111] 茹炳根. 第四届国际金属硫蛋白会议简介. *生命科学*, 1998, 10(3): 118-158.
- [112] Lee, C., J. Kwak, F.C. Anson. Application of Scanning Electrochemical Microscopy to Generation/Collection Experiments with High Collection Efficiency. *Anal. Chem*, 1991, 63(14): 1501-1504.
- [113] Zhou, F., P.R. Unwin, A.J. Bard. Scanning Electrochemical Microscopy. 16. Study of Second-order Homogeneous Chemical Reactions Via the Feedback and Generation/Collection Modes. *J. Phys. Chem.*, 1992, 96(12): 4917-4924.
- [114] Green, A.R., M.J. Stillman. Mobility of Copper in Binding Sites in Rabbit Liver Metallothionein 2. *Inorg. Chem.*, 1996, 35(10): 2799-2807.
- [115] Riddles, P.W., R.L. Blakeley, B. Zerner. Ellman's Reagent: 5, 5'-Dithiobis

(2-Nitrobenzoic Acid)-a Reexamination. *Anal. Biochem*, 1979, 94(1): 75-81.

致 谢

时间飞逝，三年的硕士求学生活即将结束。在这三年间，我从最初对科研领域的懵懂到如今的小有感悟，得到了太多人的帮助和支持，在此向他们表示衷心的感谢！

首先感谢我的导师向娟副教授对我的关怀和指导。本文从选题到成稿历经了文献收集，实验设计与开展，论文写作和修改等多道环节，每个环节中向老师都给予我恳切的指导和循循善诱的启发。他的严格要求使我在三年的求学生活中不但具备了扎实的科研能力，而且明白了很多为人处世之道。在论文写作过程中，向老师自始至终投入大量时间和精力给予帮助和指导，不辞辛劳一次次批阅，她活跃的学术思维、严谨的治学态度、求实的工作作风和勇于创新的科研精神将使我受益终生。此外，在生活上，导师也给予我无微不至的关怀和支持。在此，谨向我的导师向娟副教授致以最诚挚的谢意！

同时感谢生物传感所周飞滕教授、王建秀教授、刘又年教授、曾冬铭副教授、李霞老师和徐爱武老师在我硕士学习期间给予的指导和帮助。

三年来与师弟师妹们朝夕相处，他们在学习和生活上给了我很多的关心和帮助，让我度过了这难忘的硕士生涯。特别感谢郭军和高宇师兄在实验思路和仪器操作方面给了我热心的指导和鼓励。感谢张银堂博士，韩国城、刘斌师兄在我的学习过程中无私的帮助，感谢吕慧丹、夏宁、尹丽君、付颖师姐和何永辉、朱旭、李凯师兄在SPR、CE、QCM和UV实验中进行了大力的指导。感谢陈雄、程明、肖秀娟、宾艳南、李雪、辛宁宁等同学在实验中的大力协助和生活中的真心交流，使我们共同进步！校园的生活是美好的，感谢给予我诚挚友谊和热心帮助的同窗兄弟姐妹们，你们陪我度过了美好的三年时光！

在科研工作中，中南大学图书馆和化学化工学院等职能部门提供了很多工作和生活上的便利，生物传感所提供了工作的场所和条件，向他们表示感谢！

在攻读硕士学位期间，我的父母给予了我最大程度的理解和最周全的照顾。衷心感谢我的父亲和母亲，是他们的关心和鼓励使我在最困难的时候得以继续前行。特别感谢储文静对我的理解和支持，他对我长期关心和鼓励，使我能够忘却三年里的艰辛片段，而留下快乐和积极的回忆！

再次向所有帮助过我的老师、同学表示真挚的谢意！祝你们工作、学业顺利！身体健康！

攻读学位期间主要的研究成果

- [1] Xin, Y.L., Gao, Y., Guo, J., et al., Real-time detection of Cu^{2+} sequestration and release by immobilized apo-metallothioneins using SECM combined with SPR. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008, 24(3): 369-375.