

电化学脱附与荧光技术联用检测表面固定生物分子中的半胱氨酸残基

武丽娟¹, 王建秀¹, 李 凯¹, 徐茂田^{1,2*}

(1. 中南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410083; 2. 商丘师范学院 化学系, 河南 商丘 476000)

摘要: 建立了一种检测表面固定的多肽以及 DNA 的方法。以还原型谷胱甘肽 GSH 为模型, 将其固定在烷基硫醇自组装膜修饰的金电极表面, 通过荧光试剂 *N*-(9-吖啶) 马来酰亚胺与游离巯基反应原位标记 GSH, 恒电位条件下脱附电极表面吸附物, 检测脱附物在 0.1 mol · L⁻¹ KOH 溶液中的荧光强度。GSH 的检测限为 40 pmol · L⁻¹。该方法可扩展到检测电极表面固定的六肽 FT (含 3 个半胱氨酸残基), 脱附物的荧光强度约为 GSH 的 3 倍, 和 FT 与 GSH 中半胱氨酸残基的数量比相吻合。此外, 采用该方法对表面固定的 DNA 进行了序列特异性分析, 结果满意。电化学脱附与荧光检测联用的方法灵敏度高、重现性好、样品用量少、快速准确。

关键词: 表面固定; 生物分子; 荧光检测; *N*-(9-吖啶) 马来酰亚胺; 电化学脱附

中图分类号: O657.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2008)01-0086-05

Determination of the cysteine residues in the surface-confined biomolecules by using electrochemical desorption and fluorescence detection

WU Li-juan¹, WANG Jian-xiu¹, LI Kai¹, XU Mao-tian^{1,2*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China;
2. Department of Chemistry, Shangqiu Normal College, Shangqiu 476000, China)

Abstract: To develop a method for the detection of surface-confined peptides containing cysteine residues or oligodeoxynucleotides (ODNs) whose 3' ends modified with thiol groups, and a thiol-specific fluorescent cross-linker, *N*-(9-acridinyl) maleimide (NAM) was used. The peptides studied herein include both the oxidized and reduced forms of glutathione, and a hexapeptide (FT). Peptides are first attached onto the activated 11-mercaptopundecanoic acid (MUA)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers (SAMs) and then derivatized with NAM. The cysteine residues was determined by using electrochemical desorption and fluorescence detection. GSH concentration as low as 40 pmol · L⁻¹ can be measured. The fluorescence intensity in the case of FT is about 3 times as high as that for GSH, which is consistent with the molar ratio of cysteine residues in these two molecules. The analytical performance of gene analysis was also evaluated through the analyses of a complementary target and targets with varying numbers of mismatching bases. The method described here is simple, sensitive, reproducible, and does not require sophisticated analytical instrumentation and separation procedures.

Key words: surface-confined; biomolecule; fluorescence detection; *N*-(9-acridityl) maleimide; electrochemical desorption

多肽或蛋白质中的巯基能调节生物分子的结构和功能^[1]。例如, 癌症抑制转录因子 p53 中的半胱

氨酸可调节其与一致性双链 DNA 的结合^[2-5]。半胱氨酸是目前已知的最易被氧化的氨基酸^[6], 因此检测含有半胱氨酸残基的多肽或蛋白质在生物学上具有重要的意义。例如, Ellman 等^[7]使用 Ellman 试剂[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]对含有巯基的蛋白质进行了光谱检测, 此外, 通过蛋白质的

收稿日期: 2007-08-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20775047); 河南省自然科学基金资助项目(0511022300).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-370-2595593,
E-mail: xumaotian@163.com

巯基与某些特异性试剂结合进行荧光检测或 Western 分析也有报道^[8-10]。这些方法适用于检测溶液中含巯基的多肽或蛋白质。溶液方法的背景信号干扰大,易丢失弱的有用信息。此外,样品用量大、需要分离纯化。表面方法突出特点在于试剂用量小、信号聚焦、无需分离等。王蕴峰等^[11]合成了 Ferrocene-maleimide (Fc-Mi) 并将其用于表面固定的含巯基的 GSH、FT 以及 DNA 的检测。Baca 等^[12]采用 Biotin-maleimide 对表面固定的含巯基的蛋白质和多肽进行衍生,然后引入电活性的 Fc 包裹的纳米金/抗生蛋白链菌素络合物,实现了对表面固定的极微量的生物分子的放大检测。此外,含巯基的生物分子也用于微阵列检测和不同类型生物传感器的构建^[13]。

含巯基的生物分子可以通过标记含有发色团或电化学活性基团的试剂得以检测^[14,15]。*N*-(9-吖啶)马来酰亚胺(NAM)是一种测定巯基的特异性试剂,NAM 中的马来酰亚胺(Mi)基团可与巯基特异性结合,通过检测 NAM 中的发色基团葱基的荧光可对巯基定量。Hisayuki 等^[16]采用 NAM 标记人体驱动蛋白的半胱氨酸残基作为荧光能量转移的受体来研究该蛋白卷曲螺旋结构的有序性及能量转移效率。Kamata 等^[17]用 NAM 检测还原型辅酶 II 催化还原 GSSG 过程中释放的 GSH。本研究采用 NAM 分子检测了表面固定的含巯基的多肽以及 DNA。首先将多肽以及 DNA 螺旋固定到烷基硫醇修饰的金电极表面。多肽或寡核苷酸探针上 3' 端修饰的巯基与 NAM 特异性结合。恒电位条件下脱附电极表面吸附物,通过检测脱附物荧光强度实现对多肽定量、DNA 序列特异性分析。

材料与方 法

仪器与试剂 F-2500 型荧光分光光度计(日立公司)、CHI660B 电化学工作站(CH Instrument, 美国),三电极系统:金电极(99.999%,直径 2.0 mm)为工作电极;铂电极为对电极;Ag/AgCl(饱和 KCl 溶液)电极为参比电极(上海辰华仪器有限公司)。

还原型/氧化型谷胱甘肽(reduced/oxidized forms of glutathione, GSH/GSSG), 巯基十一酸(11-mercaptopundecanoic acid, MUA), [*N*-乙基-*N*-(3-二乙氨基丙酸)]碳二亚胺(1-(3-(dimethylamino)propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC), *N*-羟基琥珀酰胺(*N*-hydroxysulfosuccinimide, NHS), 盐酸三(2-羟基乙基)磷化氢(Tris[2-carboxyethyl]

phosphine hydrochloride, TCEP), 氨基乙醇盐酸盐(ethanol amino hydrochloride, AE), Tris-HCl 均购于 Sigma 公司;*N*-9-吖啶-马来酰亚胺(*N*-(9-acridinyl) maleimide, NAM)(日本同仁);六肽(H-Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala, FT)(Bachem 公司);寡核苷酸捕获探针的 5' 端修饰氨基;检测探针的 3' 端修饰巯基(上海生工),序列如下:

捕获探针:5'-amino-(CH₂)₆-TTT TTA GAC ATG CCC AGA CAT GCC C-3'

完全匹配靶点:5'-CTC GGT TGG ATT TGG GCA TGT CTG GGC ATG TCT-3'

四碱基错配靶点:5'-CTC GGT TGG ATT TGG GCA TGT CTG AGT AAG GCT-3'

八碱基错配靶点:5'-CTC GGT TGG ATT TGG GAA AGA CAG AGT AAG GCT-3'

检测探针:5'-TCC AAC CGA G-SH-3'

磷酸盐缓冲溶液(PBS):10 mmol·L⁻¹磷酸盐, pH 7.4。多肽、EDC/NHS、AE 用 PBS 配制。TNE 溶液:10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA 和 0.1 mol·L⁻¹ NaCl;靶点 DNA 和巯基 DNA 用 TNE 配制。实验用水均为二次去离子水。所有试剂均为现用现配。所有实验均在室温下进行。

电极的预处理与活化 将裸金电极抛光^[18], 分别用水和乙醇超声清洗 5 min, 氮气吹干。将处理好的电极在 4 mmol·L⁻¹ MUA 的乙醇溶液中浸泡 12 h, 用乙醇和二次蒸馏水先后冲洗再用氮气吹干;然后电极表面滴加 75/15 mmol·L⁻¹ 的 EDC/NHS 溶液 40 μL, 反应 40 min, 二次蒸馏水冲洗干净后氮气吹干。

多肽及 DNA 的表面固定 GSH/GSSG/FT 的表面固定:将 2 mmol·L⁻¹ GSH 40 μL 和 2 mmol·L⁻¹ TCEP 等体积混合溶液滴加到上述组装好的电极表面,水蒸气氛围下反应 4~6 h,二次蒸馏水冲洗干净后,氮气吹干。0.1 mol·L⁻¹ AE 用于封闭活化的未与 GSH 反应的酯基,封闭时间为 40 min。FT、GSSG 的组装步骤同 GSH,除 GSSG 中不添加 TCEP。

DNA 探针的表面固定及“三明治”杂交:上述活化的电极表面滴加 1 μmol·L⁻¹ 氨基 DNA 溶液(捕获探针) 40 μL,放置 4~6 h。用二次蒸馏水冲洗干净后,氮气吹干。然后将 1 μmol·L⁻¹ 完全匹配或不同数目碱基错配的靶点 DNA 溶液 40 μL 滴加到电极表面,杂交时间为 3 h。最后,在电极表面滴加 1 μmol·L⁻¹ 巯基 DNA 溶液(检测探针) 40 μL,杂交时间为 6 h。

NAM 的固定和电化学脱附 将上述修饰好的电极浸泡在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAM 的丙酮溶液中 20 h。组装好的金电极作为工作电极,对电极和参比电极分别采用铂电极和 Ag/AgCl 电极。在 -1.2 V 下 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH 溶液恒电位电解 300 s。结果 MUA 与金电极之间的 Au-S 键被破坏^[19], 电极表面组装的物质脱附到溶液中。

脱附物的荧光测定 检测上述脱附溶液的荧光强度。激发波长为 360 nm, 在 470 nm ^[20] 附近有一强荧光峰。该荧光峰对应于多肽或 DNA 上的巯基与 NAM 反应生成的络合物。

结果与讨论

如图 1 所示, 固定在金电极表面的 MUA 形成一层致密有序的自组装单层膜^[21], 采用 EDC 与 NHS 将 MUA 的羧基活化化为 NHS 酯基, 通过酯基与多肽的伯氨基相互作用, 将多肽修饰到电极表面。TCEP 用于防止 GSH 中的半胱氨酸残基被氧化为二硫化物^[22]。在含巯基的多肽中加入 TCEP 可以有效防止游离的巯基被氧化为二硫键^[23,24]。游离巯基可与 NAM 中的 maleimide 基团特异性结合, 生成强荧光物质。在强碱性溶液中还原脱附电极表面的吸附物, 检测脱附物在碱性溶液中的荧光强度。实验中以 GSH 作为模型体系, NAM 分子中的 Mi 基团与 GSH 中半胱氨酸的 SH 特异性结合, 反应摩尔比为 1:1, 通过检测 SH 与 NAM 生成的络合物荧光强度, 从而对电极表面固定的 GSH 定量。

1 GSH 的检测

如图 2 所示, 在 472 nm 附近 GSH 与 NAM 形成的络合物荧光强度约为 295.6 (曲线 A); 而在同样实验条件下, GSSG 在该波长附近没有明显的荧光信

号(曲线 B)。表明 NAM 只与 GSH 中的游离巯基有特异性的相互作用, 而与巯基的氧化产物二硫键则不存在相互作用。曲线 C 为电极表面不组装 GSH, 同样修饰 NAM, 然后进行电化学脱附所得到的荧光曲线, 较低的荧光强度表明 NAM 的非特异性吸附可以忽略。上述结果表明, 该方法可用来对表面固定的 GSH 定量。

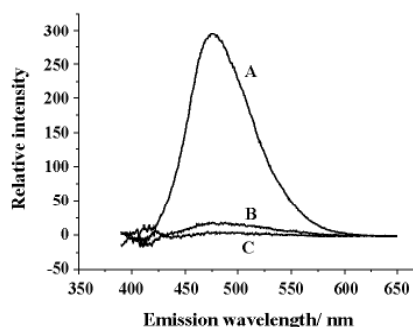


Figure 2 Fluorescence detection via electrochemical desorption in the cases of $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH (A), and $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSSG (B), and no GSH (C)

2 GSH 的工作曲线及检测限

随着 GSH 浓度增加, 荧光信号随之增强。浓度大于 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 曲线出现平台, 荧光强度达到饱和。方法的检测限为 $40 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 如图 3 所示。

3 FT 的检测

为了进一步验证方法的可行性, 作者测定了表面固定的含有 3 个半胱氨酸残基的 FT (图 4)。FT 是一种序列为 Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala 的六肽, 是金属硫蛋白 α 结构域的一个片段^[25]。电极表面组装 FT 时, 所测得的脱附物荧光强度值为 874.7。与图 2 中 GSH 情况下的荧光信号(295.6)相比, 比值

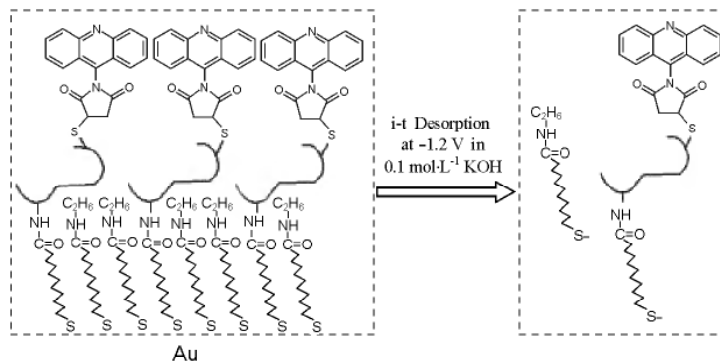


Figure 1 Schematic representation for the cross-linking of GSH and the subsequent fluorescence detection (for clarity, the alkanethiol, peptide and NAM molecules are not drawn to scale)

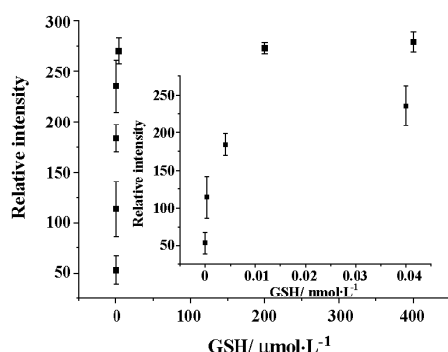


Figure 3 Dependence of the fluorescence intensity on the concentrations of GSH. The concentrations of GSH used are respectively $40 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $400 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

约为 2.959, 该值正好与 FT 和 GSH 分子中 Cys 的摩尔比 3:1 相吻合。由于 GSH 与 FT 的结构近似, 且分子大小接近, 因此组装在电极表面的分子数也基本相同, 采用该方法可对类似多肽中所含的 Cys 数目进行定量分析。

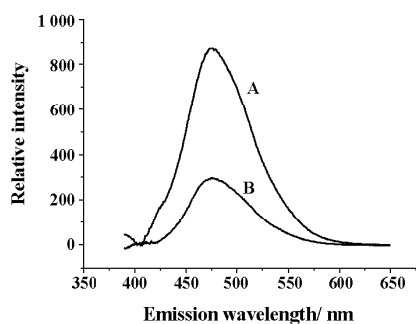


Figure 4 Fluorescence detection of surface-confined FT and GSH. A; $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FT; B; $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH

4 “三明治”杂交检测靶点 DNA

该方法可扩展到对表面固定的靶点 DNA 序列分析中。首先在金电极表面固定氨基化的 DNA 探针(捕获探针), 通过碱基互补配对原则, 捕获探针与靶点 DNA 杂交, 随后靶点 DNA 与巯基化的检测探针杂交。采用 NAM 对检测探针上的巯基衍生, 然后测定电化学脱附的强荧光物质。

当靶点 DNA 与捕获探针序列完全匹配时, 荧光强度峰值最大, 为 396.8。四碱基不匹配时, 荧光强

度随之降低, 峰值为 239.7。当靶点与捕获探针不匹配的碱基数增加为 8 个, 荧光信号峰值为 50.71, 只是完全匹配时的 12.78%。上述结果表明, 当待测靶点序列与捕获探针完全互补配对, 才能形成牢固稳定的双螺旋结构, 错配或者碱基的缺失会对双螺旋的形成和稳定产生极大的影响, 从而进一步影响巯基与 NAM 的反应。

结论

通过巯基与 NAM 的特异性相互作用, 建立了灵敏、简便的测定表面固定的 GSH 的方法, 检测限可达 $40 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时, 采用该方法检测了表面固定的 FT 以及靶点 DNA。FT 的荧光强度约为 GSH 的 3 倍, 该比值和 FT 与 GSH 中巯基的摩尔比相吻合。通过检测靶点 DNA 与捕获探针完全匹配、四碱基不匹配和八碱基不匹配时的荧光信号, 表明该方法对 DNA 的序列分析具有高度特异性。电化学脱附与荧光检测联用的方法灵敏度高、重现性好、样品用量少、快速准确。

References

- [1] Giles NM, Watts AB, Giles GI, et al. Metal and redox modulation of cysteine protein function [J]. *Chem Biol*, 2003, 10:677 - 693.
- [2] Sun XZ, Vinci C, Makmura L, et al. Formation of disulfide bond in p53 correlates with inhibition of DNA binding and tetramerization [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5:655 - 665.
- [3] Hainaut P, Milner J. A structural role for metal ions in the “wild-type” conformation of the tumor suppressor protein p53 [J]. *Cancer Res*, 1993, 53:1739 - 1742.
- [4] Jayaraman L, Murthy KG, Zhu C, et al. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53 [J]. *Genes Dev*, 1997, 11:558 - 570.
- [5] Buzek J, Latonen L, Kurki S, et al. Redox state of tumor suppressor p53 regulates its sequence-specific DNA binding in DNA-damaged cells by cysteine 277 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30:2340 - 2348.
- [6] Wright SK, Viola RE. Evaluation of methods for the quantitation of cysteines in proteins [J]. *Anal Biochem*, 1998, 265:8 - 14.
- [7] Smith DJ, Maggio ET, Kenyon GL. Simple alkane-thiol groups for temporary blocking of sulphhydryl groups of enzymes [J]. *Biochemistry*, 1975, 14:766 - 711.
- [8] Wu YL, Kwon KS, Rhee SG. Probing cellular protein targets of H_2O_2 with fluorescein-conjugated iodoacetamide and antibodies to fluorescein [J]. *FEBS Lett*, 1998, 440:

- 111 - 115.
- [9] Wu HH, Thomas JA, Momand J. p53 Protein oxidation in cultured cells in response to pyrrolidine dithiocarbamate: a novel method for relating the amount of p53 oxidation *in vivo* to the regulation of p53-responsive genes [J]. *Biochem J*, 2000,351:87 - 93.
- [10] Kim JR, Yoon HW, Kwon KS, et al. Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH [J]. *Anal Biochem*, 2000,283:214 - 221.
- [11] Wang YF, Zhu X, Hu ZB, et al. Voltammetric determination of surface-confined biomolecules with *N*-(2-ethyl-ferrocene) maleimide [J]. *Electroanalysis*, 2005, 17:2163 - 2169.
- [12] Baca AJ, Zhou FM, Wang J, et al. Attachment of ferrocene-capped gold nanoparticle/streptavidin conjugates onto electrode surfaces covered with biotinylated biomolecules for enhanced voltammetric analysis [J]. *Electroanalysis*, 2004,16:73 - 80.
- [13] Bakker E. Electrochemical sensors [J]. *Anal Chem*, 2004,76:3285 - 3298.
- [14] Gillam IC, Tener GM. *N*⁴-(6-Aminohexyl) cytidine and deoxycytidine nucleotides can be used to label RNA [J]. *Anal Biochem*, 1986,157:199 - 207.
- [15] Oda Y, Nagasu T, Chait BT. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome [J]. *Nature Biotech*, 2001,19:379 - 382.
- [16] Hisayuki M, Tatsuyuki T, Fumio A, et al. Identification of kinesin neck region as a stable α -helical coiled coil and its thermodynamic characterization [J]. *Biochemistry*, 1997,36:1933 - 1942.
- [17] Kamata T, Akasaka K, Ohrai H, et al. A sensitive fluorometric assay of glutathione reductase activity with *N*-(9-acridinyl) maleimide [J]. *Anal Sci*, 1993,9:867 - 870.
- [18] Hoogvliet JC, Dijkema M, Kamp B, et al. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: a study in phosphate buffer pH 7.4 [J]. *Anal Chem*, 2000,72:2016 - 2021.
- [19] Weisshaar DE, Lamp BD, Porter MD. Thermodynamically controlled electrochemical formation of thiolate monolayers at gold: characterization and comparison to self-assembled analogs [J]. *J Am Chem Soc*, 1992,114:5860 - 5862.
- [20] Akasaka K, Suzuki T, Ohrai H, et al. Fluorometric determination of sulfite with *N*-(9-acridinyl)-maleimide for high performance liquid chromatography [J]. *Agric Biol Chem*, 1986,50:1139 - 1144.
- [21] Bain CD, Troughton EB, Tao YT, et al. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold [J]. *J Am Chem Soc*, 1989,111:321 - 335.
- [22] Rhee SS, Burke DH. Tris(2-carboxyethyl) phosphine stabilization of RNA: comparison with dithiothreitol for use with nucleic acid and thiophosphoryl chemistry [J]. *Anal Biochem*, 2004,325:137 - 143.
- [23] Getz EB, Xiao M, Chakrabarty T, et al. A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl) phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry [J]. *Anal Biochem*, 1999,273:73 - 80.
- [24] Kizek R, Vacek J, Trnkova L, et al. Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl) phosphine [J]. *Bioelectrochemistry*, 2004,63:19 - 24.
- [25] Nieto O, Rodriguez AR. Complexation properties of the metallothionein fragment LYS-CYS-THR-CYS-CYS-ALA 56-61 MT I with zinc using square wave voltammetry [J]. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1996,40:215 - 222.