

蛋清生物模拟矿化合成荧光银纳簇和氰化物荧光探针

夏晓东* 黄昊文

(湖南科技大学化学化工学院,湘潭 411201)

摘要: 发展了一种合成荧光银纳簇的新方法。采用易得的生物蛋白材料蛋清,无需其他还原剂,调节 pH 值后,通过最简便的一锅孵化法制备了荧光银纳簇。这种合成方法类似于自然界的生物矿化现象;生物分子捕获无机离子,在功能性分子作用下进行矿化过程。高分辨透射电镜分析表明纳簇的粒径小于 2 nm。该合成方法环保经济。紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱分析表明这种银纳簇能快速响应氰离子,导致吸光度减弱,并伴随荧光猝灭。基于此原理建立了一种检测氰离子的荧光传感新方法,此分析方法显示良好的线性范围和选择性,较高的灵敏度。检测限为 $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 低于世界卫生组织推荐的饮用水标准(氰化物浓度不高于 $2.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

关键词: 蛋清; 生物矿化; 荧光; 银纳簇; 氰化物

中图分类号: O644.1; O614.122

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2011)12-2367-05

Synthesis of Eggwhite Protein-Based Fluorescent Silver Nanoclusters by Biomimetic Mineralization for Probing Cyanide

XIA Xiao-Dong* HUANG Hao-Wen

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology,
Xiangtan, Hunan 411201, China)

Abstract: A new synthesis strategy for fluorescent silver nanoclusters was developed. During this synthesis process, without any other reductants, only facile biomaterials, *i.e.*, eggwhite proteins, were used as materials and scaffolds for preparation of silver nanoclusters. By simple incubation process under the optimum conditions, this one-pot methodology yielded nanoclusters with unique optical properties. The mechanism of this synthesis strategy was presumably based on Biomimetic Mineralization: sequestering and interacting with inorganic ions, followed by providing scaffolds for minerals formed, mostly through functional proteins. The diameters of this nanoclusters were smaller than 2 nm, which characterized by the analysis of transmission electron microscopy. Obviously, this synthesis strategy was simple, environmental friendly and cost-efficient. Additionally, a novel silver nanocluster-based fluorescent probe for cyanide in aqueous solution was described. This probe relied on the cyanide etching-mediated fluorescence quenching of the silver nanoclusters, which also was confirmed by the analysis of absorption spectra. Thus sensing assay for cyanide possesses highly sensitivity and selectivity, and good linearity. With this probe, the detection limit was down to $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and lower than the maximum level ($2.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) of cyanide anion in drinking water proposed by the World Health Organization(WTO).

Key words: eggwhite; biomineralization; fluorescence; silver nanoclusters; cyanide

收稿日期:2011-06-12。收修改稿日期:2011-07-27。

国家自然科学基金(No.21075035)资助项目。

*通讯联系人。E-mail:xxdwork@126.com; 会员登记号:S060019186M。

贵金属金/银纳米簇(gold/silver nanoclusters)由数个或几十个原子构成,其粒径小于3 nm,其光电性能不同于其自身的纳米粒子(粒径3~100 nm);金/银纳米粒子的导电子被局域于电子的平均自由程而呈特有的表面等离子共振现象^[1-3];而金/银纳米簇的导电子被局域于电子的费米波长(波尔半径),导致离散电子跃迁和光致发光^[4-6]。巯基小分子保护的贵金属纳米簇通过还原(NaBH_4 作还原剂)金属离子制备^[7-8]。富含配位基团(NH_2 , COO^-)并具有特别结构特性的聚合物常用于合成贵金属荧光纳米簇^[9-10]。利用蛋白和酶也成功合成了金/银荧光纳米簇^[6,11-12];同时核酸用于合成银纳米簇^[13]。更简便的方法是利用牛血清蛋白本身的生物矿化作用,无需另加还原剂能直接合成金纳米簇^[6],而同样简便的方法合成荧光银纳米簇未见报道。

金/银纳米簇具有独特的光电性能,是重要的无机纳米材料,具有广泛的应用^[14],如催化^[15],组装光电元件^[16],生物传感和生物成像等^[18-20],同时也是重要的金属离子探针和小分子探针^[21-27]。而类似的阴离子探针文献报道相对较少。氰离子能通过配位作用腐蚀金纳米簇,基于此原理Liu等发展了一种新型的金纳米簇氰离子荧光探针^[24]。氰化物是引人关注的环境污染物,因此建立新的分析方法仍具有实际意义。

生物矿化现象是自然界的一种常见现象。利用这一自然现象可合成贵金属纳米簇^[25]。基于此原理,我们发展了一种合成荧光银纳米簇的新方法。采用易得的生物蛋白原料—蛋清,无需另加还原剂,通过控制pH值,利用生物分子自身的生物矿化功能,一锅孵化法直接合成了荧光银纳米簇:蛋清蛋白捕获银离子,在功能蛋白的作用下逐渐矿化,生成银纳米簇。该合成方法无需使用合成金/银纳米簇通用的还原剂硼氢化钠(有毒试剂),环境友好且经济。合成的银纳米簇荧光性能稳定。实验表明此银纳米簇能响应氰离子。基于氰离子的选择性荧光响应实现氰离子的检测。该分析方法具有较高的灵敏度和选择性,同时具有较好的线性关系,能实现低浓度氰化物的检测,检测下限符合实践要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高分辨透射电子显微镜(JEM-2010,日本电子株式会社),紫外-可见分光光度计(PerkinElmer, USA), FL 4500 荧光分光光度计(Hatachi, Japan),电感耦合等离子质谱仪(ICP-MS, Agilent 7500)。

透析袋(Solarbio, MWCO:8000-14000)。新鲜鸡蛋一枚,硝酸银,氰化钠均为国产分析纯,其余试剂分析纯。实验使用二次蒸馏水。

1.2 银纳米簇合成

取市售新鲜鸡蛋一枚,用1 mL移液器小心移取1 mL蛋清,分散于pH值为9.0(蛋清在中性或弱酸性条件下不能很好地在水相中分散)的10 mL缓冲溶液($2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠,用氢氧化钠调节pH值)中。取上述蛋清溶液900 μL 于小玻璃容器内,加入 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 溶液100 μL ,磁力搅匀,未见沉淀产生和颜色变化。室内孵化两昼夜,溶液颜色从无色逐渐演化为亮棕色。然后用二次蒸馏水充分透析,得纯化的银纳米簇。

1.3 表征和光谱分析

用高分辨透射电镜对银纳米簇进行了表征。吸收光谱参比液为上述蛋清溶液,石英比色皿,吸光光程为1 cm,选用仪器的标准模式,分辨率为2 nm。荧光光谱分析条件如下:激发和发射狭缝均为5.0 nm,发射光谱扫描波长为480~590 nm,可选用不同激发波长,300 μL 石英比色皿。

1.4 检测氰离子

取200 μL 上述纯化过的银纳米簇,加入不同量的氰离子(氰离子标准液由分析纯氰化钠配制),充分反应10 min后,荧光强度达到稳定值,分析其荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 银纳米簇的合成和表征

贵金属纳米簇显示特别的光电性能,成为近年来最热门的研究领域之一。这种金属纳米簇是介于原子和纳米粒子之间的实体,具有光致发光性能。其发光光谱强烈依赖于尺度效应和表面配位情况,因此荧光金/银纳米簇的合成需选用合适的表面配位基团和组装材料。尽管含有巯基,氨基,羧基和核酸碱基等官能团的功能分子被广泛应用于合成金银荧光纳米簇,但多数要使用强还原剂硼氢化钠,所以既不环保也不经济。蛋白分子富含巯基,氨基,和羧基功能基团,并具有多级结构特性,这种功能性基团和结构特点有利于纳米簇的形成^[6]。值得注意的是蛋白分子具有生物矿化功能^[6,25]。鸡蛋是人类食物的重要蛋白来源,蛋清由多种蛋白组成。我们发现蛋清蛋白具有良好的生物矿化功能,利用蛋清很方便地合成了荧光银纳米簇。合成方法简单,无需严格的条件控制。合成

过程如图 1(a)所示。蛋清在中性或弱酸性条件下不能在水中很好地分散,这是因为蛋清由多种蛋白组成,其等电点不同。实验表明,在 pH 为 9.0 的弱碱性条件下却能很好地分散。构成蛋白分子的巯基,氨基,和羧基等残基能有效捕获银离子;另一方面,由于银离子浓度低,为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,在此碱性条件下($c_{\text{OH}^-}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)不能形成 AgOH 或 Ag_2O 沉淀($K_{\text{sp}}(\text{AgOH})=1.52\times 10^{-8}$, 20°C)^[28];在蛋清功能性蛋白的生物矿化作用下,方便地合成了荧光银纳簇。通过肉眼观察溶液从无色逐渐演化为亮棕色(见图 3B 插图),确定银纳簇的形成。此矿化过程类似于牛血清蛋白对 AuCl_4^- 的矿化作用^[6],对 pH 条件有强烈的依赖性:当 $\text{pH}<8$ 时,矿化作用不能发生;而当 $\text{pH}>11$ 时,立即生成黄色 Ag_2O ,由于蛋白分子的强分散作用形成溶胶,此 Ag_2O 溶胶没有荧光特性。经过多次试验,探索出合成银纳簇的最佳条件为:pH 为 9.0;银离子浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。孵化时间需要较长,大约 2 h 后有荧光纳簇生成,2 d 后荧光强度达到稳定。值得注意的是:银离子浓度不能太大,例如银离子浓度为 $0.01 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,合成的荧光纳簇荧光强度较弱。在优化条件下合成的银纳簇具有好的水分散性,粒径均匀,小于 2 nm,见图 2 所示的电镜分析。

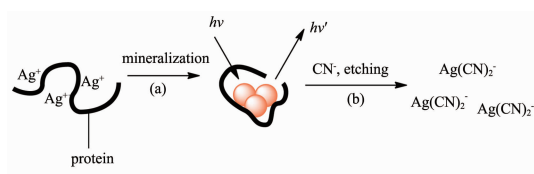


图 1 实验过程示意图

Fig.1 Schematic illustration of experimental processes

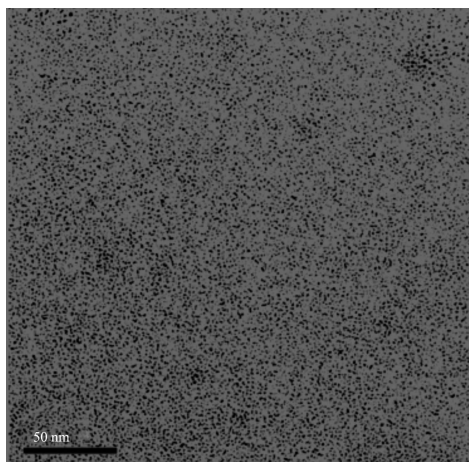
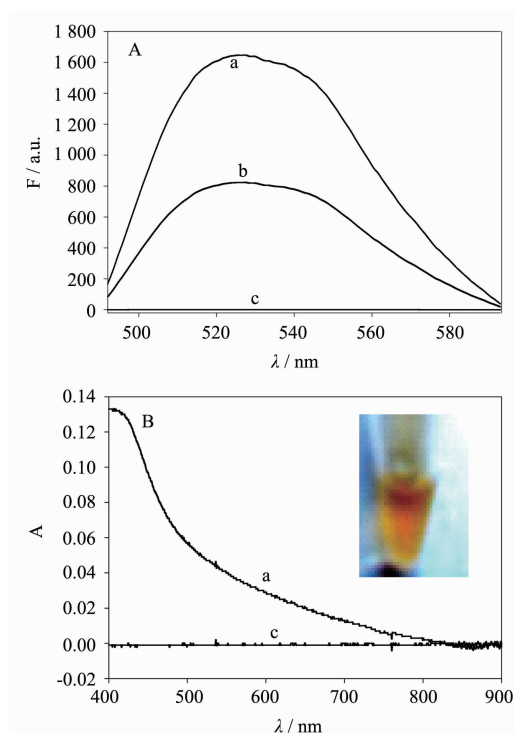


图 2 蛋清-银纳簇的 TEM 分析

Fig.2 TEM image of eggwhite protein-based silver nanoclusters

2.2 光谱特性

金/银纳簇的导电子被局域于电子的费米波长(波尔半径),导致离散电子跃迁和光致发光,这种光致发光强烈依赖于尺度效应和表面配位情况。这种蛋清蛋白合成的银纳簇显示良好的荧光特性,最大荧光发射峰为 527 nm 左右(图 3A(a)),其强度随激发波长改变,而峰形和最大发射波长不变,最大激发波长为 430 nm。吸收光谱如图 3B(a)所示,在 400~800 nm 范围内有明显吸收。



Concentration of cyanide was (a) 0; (b) 100; (c) $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The inset was the color photograph of silver nanoclusters excited by ambient light

图 3 纳簇光谱特性和氰离子响应

Fig.3 Cyanide-dependent spectra of silver nanoclusters.

(A) emission spectra and (B) absorption spectra

2.3 氰离子与银纳簇反应

如示意图 1(b)所示, CN^- 通过下列反应可腐蚀银纳簇^[26-27]:



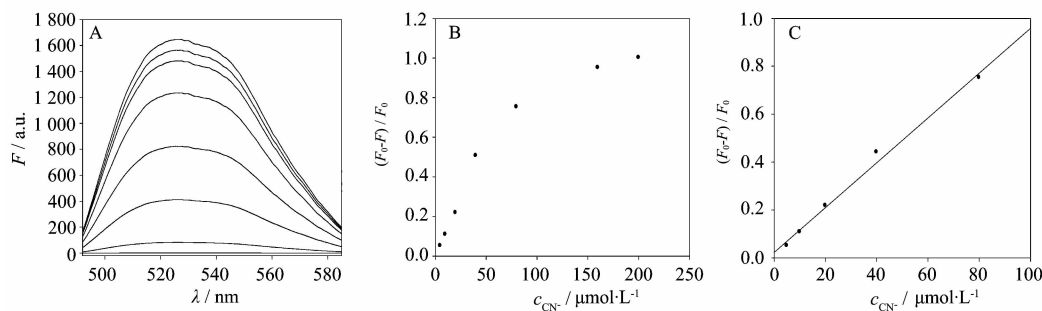
这一过程可以通过银纳簇的荧光光谱和吸收光谱变化证实。对照图 3A 中的(a),(b)和(c)的荧光强度可以看出,当加入的 CN^- 为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时其荧光强度明显猝灭,浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时几乎完全猝灭。相应地,当荧光完全猝灭时 400~800 nm 范围内的吸光度减弱为 0,对照图 3B 中的(a)和(c)。荧光光

谱和吸收光谱同时表明银纳米簇能完全被 CN^- 蚀掉, 转化为配合物离子。此时, 对溶液进行透析, 经电感耦合等离子质谱分析, 透析液的银含量为 $72 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 可能部分 $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ 仍被蛋白分子捕获, 大部分转化为游离的 $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ 。

2.4 氰离子检测

氰化物是众所周知的环境污染物。然而在电镀, 采金和其他领域仍被使用, 氰化物污染威胁依旧存在^[29]。因此, 研究更简便可靠的分析方法具有实践意义。在优化条件下, 相对于其他阴离子, 氰离子腐蚀银纳米簇具有特异性, 因此, 我们建立了一种新的氰离

子分析方法。银纳米簇对 CN^- 的响应如图 4A 所示: 随 c_{CN^-} 浓度的增加, 纳米簇的荧光强度依次猝灭, 最后降低为 0。参照文献^[30], 响应信号用 $(F_0 - F)/F_0$ 表示, F_0 和 F 分别表示无和有 CN^- 存在时的荧光强度, 图 4B 描述了纳米簇对 CN^- 的响应情况。结果表明, 如图 4C 所示, 在浓度范围为 $5.0 \sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内有很好的线性关系, 一元线性回归方程为 $y = 0.0228 + 0.0094x$, y 表示响应信号, x 为 CN^- 离子浓度, 相关系数 $R^2 = 0.9916$, 检测下限为 $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (平行测定 11 次, 3 倍信噪比)。



(A): the CN^- -dependent spectra, the CN^- concentration from top to bottom was $0, 5, 10, 20, 40, 80, 160$, and $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; (B): the CN^- -dependent response signals; (C): the calibration curve of the detection systems

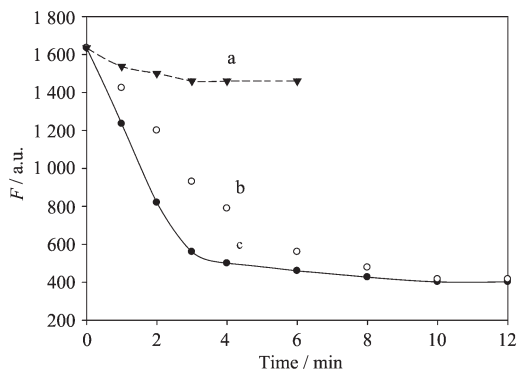
图 4 体系对 CN^- 的响应和校准曲线

Fig.4 Responsibility of the nanocluster systems toward CN^- and the calibration curve

动力学分析表明检测体系对 CN^- 的响应较快, 同时与体系中的氧浓度有关。图 5 是 CN^- 的响应动力学结果: 曲线 a 为较低浓度 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的响应过程, 能很快达到响应平衡; 当浓度增大时 (见 b 曲线, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 响应速率加快, 但响应达到平衡的时间却延长; 在通氧条件下能明显加快响应速率, 如图

5c 所示, 其浓度同样为 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对比上述结果表明, 体系对 CN^- 的响应动力学过程不但与 CN^- 的本身浓度有关, 而且取决于体系的含氧浓度; 同时也表明响应机理的正确性。

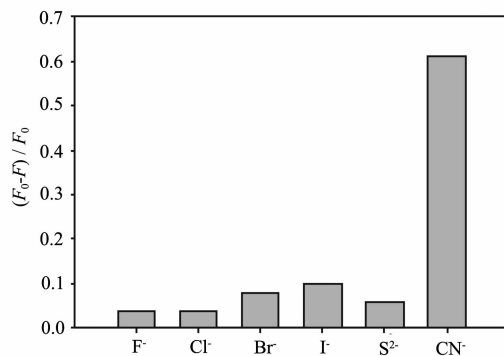
对探针的选择性进行了分析, 结果表明与银离子有较强作用的阴离子均不明显干扰检测。图 6 为浓度均为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 其他阴离子的干扰信号与相



Concentrations of CN^- : (a) $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b) and (c) $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. (c) obtained under the condition of offering oxygen

图 5 体系响应动力学

Fig.5 Kinetics of responsive systems toward CN^-



All of the concentrations of the species were $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 6 探针选择性

Fig.6 Selectivity of the CN^- probe

同浓度 CN⁻响应信号的比较,实验结果表明该探针
对 CN⁻具有很好的选择性。以校园湖水为实际样品
进行检测,采用标准加入法分析其回收率,平行测定
5 次,平均回收率为 94%。

3 结 论

利用蛋清蛋白的生物矿化作用方便地合成了荧
光银纳簇,进一步应用这种银纳簇发展了一种性能
良好的氰化物荧光探针。蛋清生物蛋白分子通过活
性基团捕获金属银离子,继而以这种蛋白分子作模
板,通过模拟生物矿化过程,成功合成了荧光性能良
好的银纳簇。合成方法经济、环保。应用该法合成的
荧光银纳簇,发展了一种实用性强的氰化物荧光探
针,方法简便,能实现低浓度氰化物的检测,检测下
限符合实践要求。

参考文献:

- [1] Link S, Elsayed M A. *J. Phys. Chem. B*, **1999**,**103**:6410-8426
- [2] XIA Xiao-Dong(夏晓东), YI Ping-Gui(易平贵). *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009**,**25**(7):1320-1322
- [3] XIA Xiao-Dong(夏晓东), YI Ping-Gui(易平贵), YU Xian-Yong(于贤勇). *Chin. J. Appl. Chem.(Yingyong Huaxue)*, **2009**,**26**(12):1456-1460
- [4] ZHANG Pu(张普), WANG Yan(王焱), LIU Zhong-De(刘忠德), et al. *Scientia Sinica Chimica (Zhongguo Kexue)*, **2011**,**41**(6):1037-1043
- [5] Zheng J, Nicovich P R, Dickson R M. *Annu. Re. Phys. Chem.*, **2007**,**58**:409-431
- [6] Xie J, Zheng Y, Ying J Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**:888-889
- [7] Negishi Y, Chaki N K, Shichibu Y, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**(37):11322-11323
- [8] Negishi Y, Nobusada K, Tsukuda T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**,**127**(14):5261-5270
- [9] Grohn F, Bauer B J, Akpalu Y A. *Macromolecules*, **2000**, **33**:6042-6050
- [10] Shang L, Dong S. *Chem. Comm.*, **2008**,**44**:1088-1090
- [11] Xu H X, Suslick K S. *Adv. Meter.*, **2010**,**22**:1078-1082
- [12] Wen F, Dong Y H, Feng L, et al. *Anal. Chem.*, **2011**,**83**(4):1193-1196
- [13] Guo W, Yuan J, Wang E. *Chem. Comm.*, **2009**,**45**:3395-3397
- [14] Sfer M Y, Qian H, Nobusada K, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2011**,**115**:26200-6207
- [15] Miyamura H, Matsubara R, Miyazaki Y, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**,**46**(22):4151-4154
- [16] Lee W I, Bae Y. *J. Bard A. J. Am. Chem. Soc.*, **2004**,**126**:8358-8359
- [17] Guo W, Yuan J, Dong Q, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, **132**:932-934
- [18] Liu C L, Ho M L, Chen Y C, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2009**, **113**:21082-21089
- [19] Huang C C, Yang Z, Lee K H, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**,**46**:6824-6828
- [20] YUAN Yuan(袁媛), HE Xiao-Xiao(何晓晓), SHI Hui(石慧), et al. *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **2010**,**31**(11):2167-2172
- [21] Liu S, Lu F, Zhu J J. *Chem. Comm.*, **2011**,**47**:2661-2663
- [22] Jin L, Shang L, Guo S, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**,**26**:1965-1969
- [23] Han B, Wang E. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**,**26**:2585-2589
- [24] Liu Y, Ai K, Cheng X, et al. *Adv. Fuct. Mater.*, **2010**,**20**:651-956
- [25] Slocik J M, Wright D W. *Biomacromolecules*, **2003**,**4**:1135-1141
- [26] Cointet C, Mostafavi M, Khatouri J, et al. *J. Phys. Chem. B*, **1997**,**101**:3512-3516
- [27] Hodge V F, Folsom T R. *Anal. Chem.*, **1972**,**44**(2):381-383
- [28] Biedermann G, Sillén L G. *Acta Chem. Scand.* **1960**,**14**:717-725
- [29] Sun H, Zhang Y Y, Si S H, et al. *Sens. Actuators, B Chem.*, **2005**,**108**:925-932
- [30] Bimalendu A, Arindam B. *Chem. Mater.*, **2010**,**22**:4364-4371