

基于多肽与金属离子作用的一种高选择性 Cd^{2+} 荧光比率传感器

王召璐 冯慧云 李 艳 许 涛 薛泽春 李连之*

(聊城大学化学化工学院, 聊城 252059)

摘要: 利用固相多肽合成法合成了一种新的多肽, 将该多肽与荧光基团 Dansyl 偶联制备了一种新的荧光化学比率传感器: Dansyl-Cys-Pro-Pro-Cys-Trp-NH₂。利用荧光光谱研究了它与金属离子的相互作用。结果表明, 与其它 13 种金属离子相比该多肽对金属 Cd^{2+} 有很好的选择性。它能特异性识别 Cd^{2+} , 具有水溶性好, 响应时间快等优点。该肽对 Cd^{2+} 具有很强的键合作用, 其结合常数为 $3.0 \times 10^{11} \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$, 检出限为 $11.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 多肽; Cd^{2+} ; 荧光化学传感器; 荧光比率; 荧光共振能量转移

中图分类号: O614.24² 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2015)10-1946-07

DOI: 10.11862/CJIC.2015.261

A High Selective Fluorescent Ratio Sensor for Cd^{2+} Based on the Interaction of Peptide with Metal Ion

WANG Zhao-Lu FENG Hui-Yun LI Yan XU Tao XUE Ze-Chun LI Lian-Zhi*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China)

Abstract: A new fluorescent ratio chemosensor (Dansyl-Cys-Pro-Pro-Cys-Trp-NH₂) for metal ions has been synthesized via Fmoc solid-phase peptide synthesis. The interactions of the peptide with metal ions were investigated by fluorescence spectroscopy. Results showed that it showed high selectivity toward Cd^{2+} over other commonly coexistent metal ions. The peptide has the advantages of specific recognition to Cd^{2+} , a good water-soluble and a fast response. The peptide tightly binds to Cd^{2+} with the binding constant of $3.0 \times 10^{11} \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ and the detection limit of $11.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: peptide; Cd^{2+} ; fluorescent chemosensor; fluorescent ratio; fluorescence resonance energy transfer

镉(Cd)是一种危害性很大的重金属,它能够通过食物链在人和其他动物的体内积累,引起肝病、肺病和慢性脑炎等疾病^[1]。长期暴露在 Cd^{2+} 源中甚至可引某些癌症^[2]。上世纪发生在日本的“骨痛病”就是由于人们长期食用“镉米”和饮用含镉的水造成的镉慢性中毒^[3]。按世界卫生组织标准,瓶装水中镉不超过 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[4],因此镉离子的检测尤为重要。研究高灵敏性、高选择性和快速检测镉离子方法具有重要意义。虽然已有一些仪器方法如原子吸收等可以灵敏地检测镉离子^[5],但存在着仪器昂贵、

不能及时现场检测、制备样品复杂等缺点,难以被广泛普及。近年来,用于检测金属离子的化学传感器引起人们的广泛关注,主要是由于它们具有简单快速,对待测金属离子有高的选择性和灵敏性^[6-10]。其中荧光化学传感器已成为引人注目的检测重金属离子的理想化学传感器^[11-12]。典型的荧光化学传感器的结构包含有 2 个组成元件,一个是产生信号的荧光基团,另一个是具有客体识别能力的接受体。接受体用来选择性的辨别和键合金属离子,作为受体的荧光基团主要用来传递荧光信号。一个理

收稿日期:2015-01-11。收修改稿日期:2015-07-23。

山东省自然科学基金(No.ZR2011BL002)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: lilianzhi1963@163.com; 会员登记号: S06N1205M1202。

想的荧光传感器应具有易合成、水溶性好、灵敏度高、选择性好、检出限低等特点^[13]。目前报道的大部分荧光传感器含有有机分子组成的螯合单元,这些螯合单元的合成条件非常苛刻而且它们的键合往往不是可逆的^[14-16]。鉴于有机分子的这些弱点,用于检测金属离子的多肽传感器引起人们的注意。多肽基传感器有以下优点^[17-20]:由天然氨基酸组成,很容易通过固相多肽合成法(SPPS)合成;选择性和灵敏性能够通过进一步地改变氨基酸序列来进行优化;能应用于水溶液。最早报道的多肽基荧光传感器是基于锌指蛋白的一个含有 25 个氨基酸残基的肽^[21]。用于检测 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 的多肽传感器已有报道^[22]。然而,目前用于检测 Cd^{2+} 的肽基荧光传感器还很少^[23-24]。近年来,对于重金属离子检测的比率荧光传感器变得引人注目,主要是由于它们使得以最小空白信号更准确地测量分析物成为可能^[25-26]。Lee 等报道过一种肽基比率荧光传感器,用于在水溶液中检测 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ag^{+} 等^[27],但选择性不理想。

我们实验室报道了一种检测 Cd^{2+} 的多肽荧光传感器^[28]。本文通过对其多肽序列进行优化合成了一个新的多肽荧光传感器 Dansyl-Cys-Pro-Pro-Cys-Trp- NH_2 (简称为 D-P5),利用荧光光谱研究了它与重金属离子的相互作用。结果表明, Cd^{2+} 离子对其具有独特的荧光增强效应,与我们以前报道的相比提高了它的检出限。此方法简便快速、成本低廉,有望得到实际应用。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Fmoc-L-Trp(Boc)-OH(色氨酸)、Fmoc-L-Cys(Trt)-OH(半胱氨酸)、Fmoc-L-Pro-OH(脯氨酸)和 Fmoc-L-Cys(Trt)-OH(半胱氨酸),Rink Amide 树脂,*o*-苯并三氮唑-四甲基脒六氟磷酸酯(HBTU)和 1.2 mmol *N*、*N*-二异丙基乙胺(DIEA)和茴香硫醚均为上海吉尔生化公司产品;乙二硫醇(EDT)、三氟乙酸(TFA)和 *N*、*N*-二甲基甲酰胺(DMF)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)及各种金属盐等均为市售分析纯试剂。丹黄酰氯购自北京普益华科技有限公司。实验中所用的各种金属离子溶液均用含 100 mmol·L⁻¹ NaClO₄ 的 50 mmol·L⁻¹ HEPES(pH 7.0)缓冲溶液新鲜配制。

CS136 多肽合成仪(美国 C S Bio Co.);CR22G 高速冷冻离心机(日本日立公司);LS55 荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司);Q-Star XL 电喷雾质

谱仪(美国 ABI 公司)。

1.2 多肽的合成

多肽的合成在 CS136 固相多肽合成仪上进行,采用的是标准的 Fmoc 固相合成法^[29]。按取代度 0.66 mmol·g⁻¹ 计算称取 0.2 mmol 的 Rink Amide 树脂置于反应瓶中,加入适量 DMF 溶胀 1~2 h。在对应的氨基酸储瓶中加入 0.6 mmol HBTU 和 1.2 mmol DIEA 的 DMF 溶液和 0.6 mmol 相应的氨基酸,按肽链顺序从 C 端向 N 端依次加入氨基酸 Fmoc-L-Trp(Boc)-OH、Fmoc-L-Cys(Trt)-OH、Fmoc-L-Pro-OH 和 Fmoc-L-Cys(Trt)-OH,根据设定的程序自动进行反应。每次偶合反应之后均用茚三酮显色法检测,若树脂无色或淡黄色证明反应完全,若树脂呈蓝紫色需延长时间或者加大氨基酸的量等方法再次偶合。丹黄酰氯的偶合步骤是:将 1.2 mmol HBTU 和 0.6 mmol 的丹黄酰氯用 10 mL 的 DMF 溶解后,按设定好的程序自动反应。所有氨基酸偶合完成后,用无水甲醇洗涤树脂,真空干燥。然后进行多肽 D-P5 的切割,称量干燥的树脂,按质量的 10 倍加入切割液(82.5% 三氟乙酸+5%水+5%苯酚+5%茴香硫醚+2.5%乙二硫醇),常温下避光切割 3~4 h,过滤,树脂用少量 TFA 洗涤,保留滤液^[30]。用高纯氮气吹去 TFA,加入 5~10 倍量冰冷的无水乙醚,置-20℃静置过夜,析出白色絮状沉淀,离心收集沉淀,用少量无水乙醚洗涤,真空干燥。由制备型液相色谱纯化得到的多肽的冻干粉在纯水中溶解后,用分析型高效液相色谱仪进行分析。分析柱为 Spherigel C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)流动相 A:0.1% TFA 水溶液,B:甲醇。线性梯度:20% B-100% B,洗脱时间为 30 min,进样量 20 μL,流速为 1 mL·min⁻¹,检测波长为 275 nm。

1.3 荧光光谱的测定

1.3.1 Cd^{2+} 的荧光响应研究

将五肽溶于含 100 mmol·L⁻¹ NaClO₄ 的 50 mmol·L⁻¹ HEPES(pH 7.0)缓冲溶液中,在比色皿中准确加入 3.0 mL 10 μmol·L⁻¹ D-P5 溶液,然后用微量进样器逐次加入 Cd^{2+} (1 mmol·L⁻¹)溶液,使 Cd^{2+} 的浓度分别为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μmol·L⁻¹。固定激发波长分别为 290 nm 和 330 nm,分别测量 310~570 nm 和 400~640 nm 范围的荧光发射光谱。激发和发射狭缝分别为 5 和 10 nm。扫描速度为:300 nm·min⁻¹。加入的金属离子溶液总体积为 30 μL,远小于 3.0 mL,所以实验中体积变化可忽略。

1.3.2 其它金属离子的荧光响应研究

在比色皿中准确加入 3.0 mL $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-P5 溶液,测定其荧光发射光谱。然后分别加入等物质的量的用相同缓冲液配制的 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 和 K^{+} 溶液,使金属离子的浓度均为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。固定激发波长为 290 nm,测量 310~570 nm 范围内的荧光发射光谱。激发和发射狭缝分别为 5 和 10 nm,扫描速度为 $300 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.3.3 pH 值对 D-P5 及 D-P5/ Cd^{2+} 荧光光谱的影响

用 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaClO_4 (pH 7.0) 缓冲溶液配制 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D-P5 溶液,然后用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 和 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节 pH 值。测量 D-P5 及 D-P5/ Cd^{2+} 的荧光光谱,测量条件同 1.3.2。

1.4 检出限的确定^[27]

D-P5 对 Cd^{2+} 检出限的确定是基于 D-P5 与 Cd^{2+} 滴定曲线。为了确定 S/N,重复测量 10 次 D-P5 的荧光光谱,然后确定空白的标准偏差。对不同 Cd^{2+} 浓度对应的荧光强度对 Cd^{2+} 浓度的图像进行线性拟合,得出斜率,通过下面的方程计算检出限:

$$\text{LOD} = \frac{3\text{SD}}{m}$$

其中 SD 为空白的相对标准偏差, m 代表直线的斜率。

2 结果与讨论

2.1 多肽的合成

采用标准的 Fmoc 固相合成法合成了一个新的多肽 Dansyl-Cys-Pro-Pro-Cys-Trp- NH_2 。将 D-P5 经过高效液相色谱图分析,在高效液相色谱上 20~22 min 内有一个尖峰,而其他的峰很小可以忽略。说明 D-P5 的纯度还是比较高的。电喷雾质谱中的质子峰 $m/z=837.29$ 和 $m/z=859.57$ 分别对应于 $[\text{D-P5}+\text{H}]^+$ 和 $[\text{D-P5}+\text{Na}]^+$ 。它们与该肽的分子量 836.4 相吻合,这表明合成的肽的正确性。

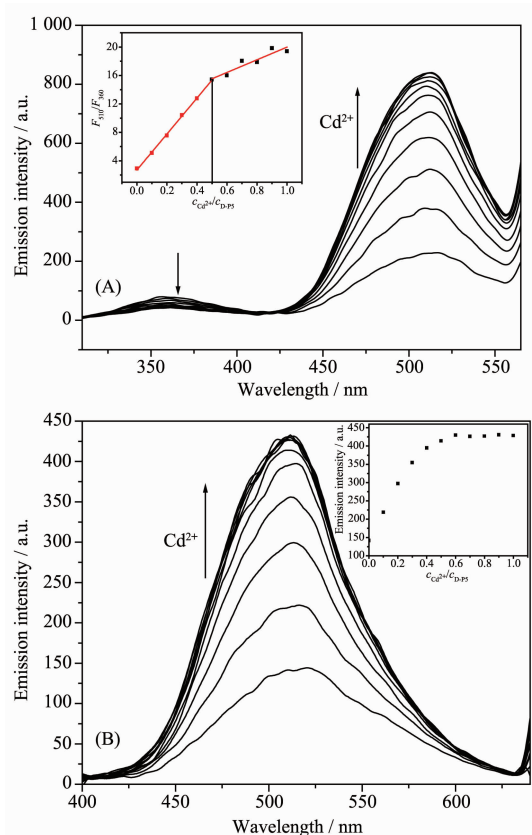
2.2 荧光光谱

2.2.1 Cd^{2+} 的荧光响应研究

D-P5 的荧光光谱测量是在 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES 缓冲溶液中进行的。图 1(A)为以 290 nm 激发时,不同浓度 Cd^{2+} 存在下 D-P5 的荧光光谱图。从图中可以看到,360 nm 处有一弱的发射峰,510 nm 处有一强的发射峰,它们分别是 Trp 基团和 dansyl

基团的荧光发射响应。随着 Cd^{2+} 浓度从 0 增加到 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,510 nm 处的荧光强度逐渐增强而在 360 nm 处的荧光强度却逐渐减弱。从内嵌图可以看出,荧光发射比率 F_{510}/F_{360} 从 2.88 增加到 19.45。当 $c_{\text{Cd}^{2+}}:c_{\text{D-P5}}=1:2$ 时, F_{510}/F_{360} 比值出现拐点,说明 D-P5 与 Cd^{2+} 的结合比为 2:1。这个结果表明,在 Cd^{2+} 存在下, D-P5 发生了荧光共振能量转移(FRET),即 Cd^{2+} 与多肽中半胱氨酸残基上的-SH 发生配位作用,使 D-P5 发生折叠,从而拉近了 Trp 和 dansyl 之间的距离^[29],此时 Trp 基团作为能量供体将能量无辐射地转移给作为能量受体的 dansyl 基团。这种能量转移导致了荧光光谱中 360 nm 处荧光强度的降低和 510 nm 处荧光强度的增加。

当以 330 nm 为激发波长时只可以观测到 Dansyl 基团在 510 nm 处的荧光响应。如图 1(B),将 Cd^{2+} 逐渐加入 D-P5 溶液中时,可以看出 510 nm 波



$c_{\text{Cd}^{2+}}=0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; (A) $\lambda_{\text{ex}}=290 \text{ nm}$, (B) $\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$. Inset: (A) plot of F_{510}/F_{360} vs $c_{\text{Cd}^{2+}}/c_{\text{D-P5}}$, (B) plot of F_{510} vs $c_{\text{Cd}^{2+}}/c_{\text{D-P5}}$

图 1 不同浓度的 Cd^{2+} 存在下 D-P5 的荧光发射光谱

Fig.1 Fluorescence emission spectra of D-P5 in the presence of different concentration of Cd^{2+}

长处的荧光发射强度逐渐增加。这说明由于多肽与 Cd^{2+} 的结合, Cd^{2+} 配位阻断了从整合团到荧光团的光致电子转移过程, 导致荧光增强^[2]。可能其他因素也会参与导致荧光增强效应。从内嵌图中可以看出, 当 $c_{\text{Cd}^{2+}}:c_{\text{D-P5}}=1:2$ 时发射强度达到饱和状态, 说明 D-P5 与 Cd^{2+} 的结合比为 2:1。

值得注意的是, 图 1 中 2 个滴定曲线图显示饱和和配位后具有不同趋势: 比例计量滴定曲线显示达到 1:2 配位后探针发射双带比例以另一较小的斜率增大, 似有另一结合过程; 然而增强滴定曲线显示达到 1:2 配位后不再发生新的变化。为解释这一现象, 我们将图 1(A) 中的比例计量滴定曲线数据分开, 分别做出 F_{510} 对 $c_{\text{Cd}^{2+}}:c_{\text{D-P5}}$ 和 $1/F_{360}$ 对 $c_{\text{Cd}^{2+}}:c_{\text{D-P5}}$ 2 个图(未给出, 与图 1(B) 和图 1(A) 中插图类似)。从所得图中可知, 当达到 1:2 配位后探针在 510 nm 处的荧光强度几乎不变化, 与增强滴定曲线的结论一致, 并没有发生新的变化。但达到 1:2 配位后 $1/F_{360}$ 曲线以另一较小的斜率增大, 与比例计量滴定曲线的结论一致。这说明在达到 1:2 配位后, 360 nm 处的荧光强度还存在一个较小程度的猝灭现象, 而 510 nm 处的荧光强度几乎没有变化。360 nm 处的荧光是色氨酸残基(Trp)发射峰, 这说明当 Cd^{2+} 达到饱和后, 继续加入 Cd^{2+} 会使 Trp 发生荧光猝灭作用, 使 360 nm 处的荧光强度降低。

图 2 是 D-P5 与 Cd^{2+} 相互作用可能的机理图。当 Cd^{2+} 存在时, 使 D-P5 发生折叠, Trp 和 Dansyl 之

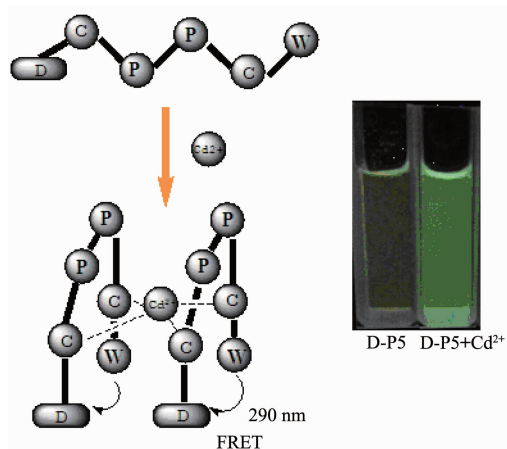


图 2 D-P5 与 Cd^{2+} 作用的可能键合模式和紫外光下加入 Cd^{2+} 前后 D-P5 溶液的荧光照片

Fig.2 Proposed possible binding mode of D-P5 with Cd^{2+} and the fluorescence image of D-P5 solution before and after addition of Cd^{2+} under ultraviolet light

间的距离接近, 为 D-P5 发生了荧光共振能量转移(FRET), Trp 基团作为能量给体将能量无辐射地转移给作为能量受体的 Dansyl 基团提供了条件。从紫外灯下的图片可以看出, 加入 Cd^{2+} 前后, D-P5 有明显的颜色变化, 从无色变为浅绿色, 可以定性的检测 Cd^{2+} 。

2.2.2 多种金属离子的荧光响应研究

为了探讨 D-P5 对金属离子结合的选择性, 研究了 D-P5 溶液对其它金属离子的荧光响应。测定了包括一些过渡金属离子和主族金属离子与 D-P5 相互作用的荧光光谱。

通过荧光比率 F_{510}/F_{360} 来体现和比较它对不同金属离子的选择性。图 3 为不同金属离子存在时 D-P5 溶液荧光比率(F_{510}/F_{360})增量的柱状图。结果表明, 向 D-P5 溶液中分别加入 1 倍的 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 和 1 000 倍的 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 等离子后, 荧光比率没有明显的变化。加入 1 倍的 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{+} 、 Zn^{2+} 后荧光比率稍有增强。值得注意的是 D-P5/ Cd^{2+} 的荧光比率分别为 D-P5/ Cu^{2+} 、D-P5/ Zn^{2+} 和 D-P5/ Hg^{2+} 的 2.03 倍、2.13 倍和 2.42 倍, 这说明这些离子对 Cd^{2+} 检测的干扰较小。实验表明, D-P5 对 Cd^{2+} 有很高的选择性。因此, 可以成为检测 Cd^{2+} 的传感器从而应用于实践中。

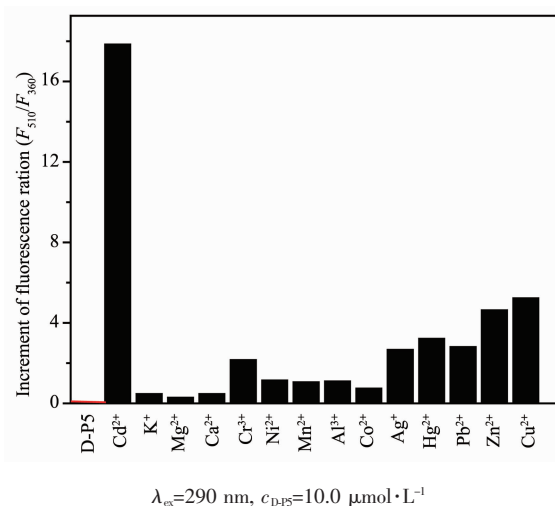
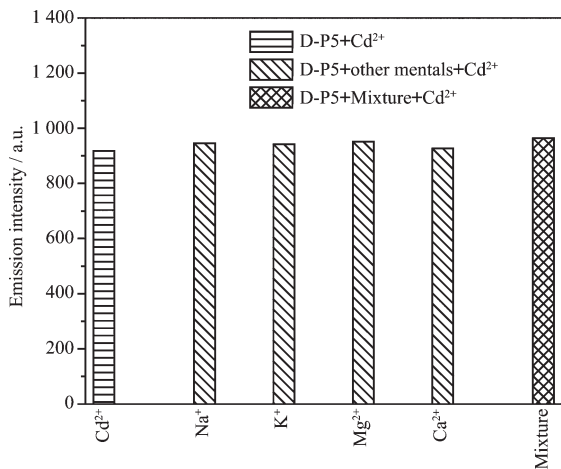


图 3 金属离子存在时 D-P5 溶液荧光比率(F_{510}/F_{360})增量
Fig.3 Increment of fluorescence ratio (F_{510}/F_{360}) of the peptide in the presence of different metal ions

由于碱金属离子大量存在于环境及生物体中, 所以研究了在 D-P5/ Cd^{2+} 体系中存在大量第 I、II 主族金属离子时的荧光响应。如图 4, 当碱金属离子的浓度达到 Cd^{2+} 浓度的 1 000 倍, D-P5/ Cd^{2+} 体系的荧

光发射强度却没有受到明显的影响。这个结果说明碱金属和碱土金属的存在对重金属 Cd^{2+} 的检测几乎没有干扰。

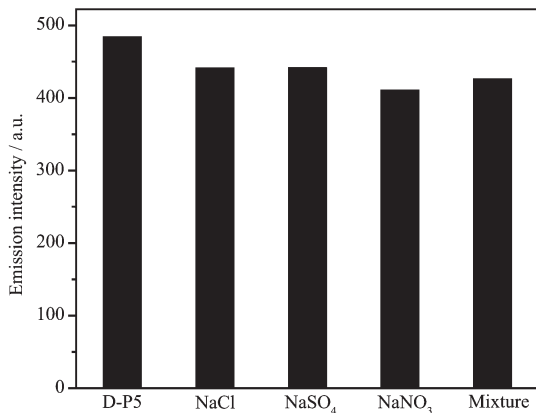


Concentrations for Cd^{2+} was $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} was $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

图 4 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 离子存在时 D-P5/ Cd^{2+} 体系的荧光强度柱状图

Fig.4 Fluorescence intensity of D-P5/ Cd^{2+} in the presence of various metal ions

为考察不同阴离子对该体系荧光性质的影响,在相同实验条件下测定了不同阴离子存在下 D-P5 荧光光谱。如图 5 所示,在 D-P5 溶液中分别加入不同的钠盐,当钠盐的浓度达到 D-P5 的 1 000 倍时, D-P5 在 510 nm 处的荧光发射强度几乎没有发生变化。这说明这些阴离子对 Cd^{2+} 的检测几乎没有干扰。



Concentration for D-P5 was $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- was $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

图 5 不同阴离子对 D-P5 510 nm 处荧光强度的影响
Fig.5 Fluorescence intensity of D-P5 at 510 nm in the presence of various anion ions

多肽对于金属离子的选择性键合作用机制主要由两者的本性决定, 主要与多肽的氨基酸种类、序列和结构构象有关。这个探针中有特殊的 Cys-X-X-Cys 结构, 根据软硬酸碱理论, -SH 作为典型的软碱性配位基团很容易与作为软酸的 Cd^{2+} 选择性结合, 当然还与多肽的空间结构相关。

2.3 pH 值对 D-P5 及 D-P5/ Cd^{2+} 荧光光谱的影响

体系的 pH 值是一个重要的参数, 因此我们研究了 pH 对 D-P5 及 D-P5/ Cd^{2+} 荧光光谱的影响。从图 6 可以得知, 当 pH 值低于 5 时 D-P5 及 D-P5/ Cd^{2+} 荧光强度都很弱, 这说明此时 Cd^{2+} 与 D-P5 的相互作用很弱。当 $\text{pH} \geq 5$ 时, D-P5/ Cd^{2+} 的荧光比率 F_{510}/F_{360} 随着 pH 值的增加而增加, 但是 D-P5 的荧光比率 F_{510}/F_{360} 没有明显的变化。这表明 D-P5 与 Cd^{2+} 在 $\text{pH} > 5$ 时发生相互作用, 这样就明显增强了 FRET 效应。这是由于 Cys 残基侧链-SH 基团发生去质子化增加了负电荷所致^[22]。而 $\text{pH} > 7$ 时, Cd^{2+} 易发生水解降低了其与 D-P5 的结合。当 $\text{pH} = 7$ 时, 荧光比率 F_{510}/F_{360} 达到最大值, 这说明在中性状态下 D-P5 对 Cd^{2+} 的检测是最佳的。综上, 本实验选用了 $\text{pH} = 7$ 的条件来对 Cd^{2+} 进行定量分析。

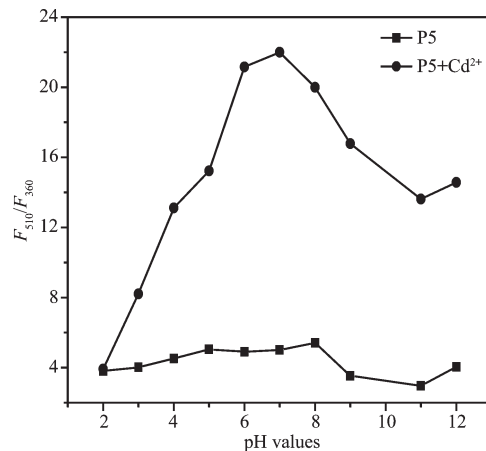


图 6 pH 值对 D-P5 和 D-P5/ Cd^{2+} 荧光比率(F_{510}/F_{360})的影响

Fig.6 Effects of pH values on the fluorescence ratio (F_{510}/F_{360}) of D-P5 and D-P5/ Cd^{2+} system

2.4 Cd^{2+} 与 D-P5 的结合常数

通过计算 Cd^{2+} 与 D-P5 的结合常数来评估 D-P5 与 Cd^{2+} 的键合程度。结合常数的计算是基于 Cd^{2+} 与 D-P5 作用的滴定曲线, 通过以下方程拟合得到^[31-32]。

$$F(x) = \frac{F_0 + F_{\infty} K_a x^n}{1 + K_a x^n}$$

其中, x 为 Cd^{2+} 的浓度, F_0 为无 Cd^{2+} 时体系的荧光强度, $F(x)$ 为特定浓度下体系的荧光强度, F_{∞} 为所有的 D-P5 与 Cd^{2+} 配位时的荧光强度, K_a 为结合常数。

如图 7, 以 D-P5 与 Cd^{2+} 为 2:1 的键合模式通过对 510 nm 处的荧光发射强度进行非线性最小二次方拟合分析, 求得结合常数 K_a 为 $3.0 \times 10^{11} \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ 。这说明 D-P5 和 Cd^{2+} 有高的键合亲和性, 是由于 D-P5 中 2 个 Cys 残基的巯基与 Cd^{2+} 形成稳定的配位键所致。

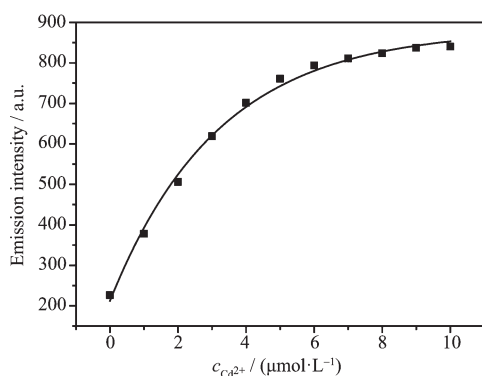


图 7 荧光发射强度对 Cd^{2+} 浓度的非线性最小二乘拟合曲线

Fig.7 Nonlinear least-squares fitting curve for emission intensity vs $c_{\text{Cd}^{2+}}$

2.5 检出限的确定

通过荧光比率和 Cd^{2+} 浓度之间的线性关系计算 D-P5 的检出限。图 8 为 D-P5 传感器对重金属 Cd^{2+} 检测的灵敏度, 以 510 和 360 nm 处的荧光比率 (F_{510}/F_{360}) 对 Cd^{2+} 浓度作图。当 Cd^{2+} 浓度低于 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随着 Cd^{2+} 浓度的增加荧光发射强度呈比例增加。通过计算得到其检出限为 $11.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。比我们实验室曾报道的检测 Cd^{2+} 的传感器检出限低^[28]。

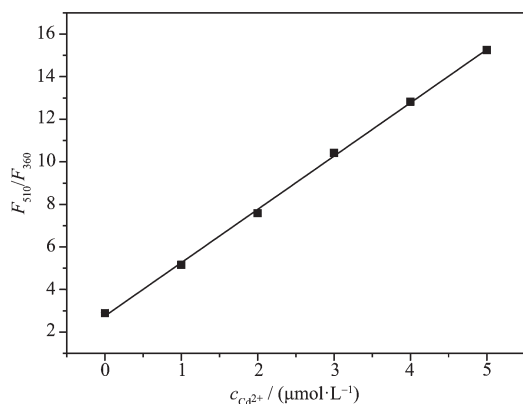


图 8 D-P5 的荧光比率 F_{510}/F_{360} 对 $c_{\text{Cd}^{2+}}$ 作图

Fig.8 Plot of fluorescent ratio F_{510}/F_{360} of D-P5 vs $c_{\text{Cd}^{2+}}$

3 结 论

通过 Fmoc 固相合成法合成了一个新的多肽基荧光比率化学传感器。利用荧光光谱研究了其与金属离子的相互作用。结果表明, D-P5 对 Cd^{2+} 有很好的选择性和灵敏性, 它主要是基于 Trp 残基和荧光基团 Dansyl 之间的荧光共振能量转移机理来进行传感的。D-P5 与 Cd^{2+} 相互作用形成 2:1 的配合物, 求得其结合常数为 $3.0 \times 10^{11} \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ 。它能用于中性溶液中 Cd^{2+} 的高灵敏度检测, 检出限为 $11.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] Huff J, Lunn R M, Waalkes M P, et al. *Int. J. Occup. Environ. Health*, **2007**, *13*(2):202-12
- [2] Bridges C C, Zalups R K. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**, *204*(3):274-308
- [3] ZHU Zhi-Jun(朱志军), LIU Dian-Jun(刘殿骏), WANG Zhen-Xin(王振新). *Chinese J. Appl. Chem.*(应用化学), **2013**, *30*(6):716-722
- [4] World Health Organization, Avenue Appia 20, 1211 Geneva 27, Switzerland. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cadmium/en
- [5] Li Y, Chen C, Li B, et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2006**, *21*(1):94-96
- [6] Callan J F, de Silva A P, Magria D C. *Tetrahedron*, **2005**, *61*(36):8551-8588
- [7] Kim J S, Quang D T. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*(9):3780-3799
- [8] Liu Y, Zhang S W, Miao Q, et al. *Macromolecules*, **2007**, *40*(14):4839-4847
- [9] Clark M A, Duffy K, Tibrewala J, et al. *J. Org. Lett.*, **2003**, *5*(12):2051-2054
- [10] Nolan E M, Lippard S J. *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*(1):193-203
- [11] Fu Q, Tang Y, Shi C, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, *49*(11):399-402
- [12] Haugland R P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th Ed. Eugene, OR, USA: Molecular Probes, Inc., **1996**.
- [13] Kramer R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, *37*(6):772-773
- [14] Beltramello M, Gatos M, Mancin F, et al. *Tetrahedron. Lett.*, **2001**, *42*(52):9143-9146
- [15] Klein G, Kaufmann D, Schurch S, et al. *Chem. Commun.*, **2001**(6):561-562
- [16] Prodi L, Montalti M, Zaccheroni N, et al. *Helv. Chim. Acta*,

- 2001,84**(3):690-706
- [17]Kim J S, Quang D T. *Chem. Rev.*, **2007,107**(9):3780-3799
- [18]Merrifield R B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963,85** (14):2149-2154
- [19]Bridges C C, Zalups R K. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005, 204**(3):274-308
- [20]Von Zglinicki T, Edwall C, Ostlund E, et al. *J. Cell Sci.*, **1992,103**(4):1073-1081
- [21]Walkup G K, Imperiali B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996,118**(12):3053-3054
- [22]Joshi B P, Cho W M, Kim J S, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007,17**(23):6425-6429
- [23]Huston M E, Engleman C, Czarnik A W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990,112**(19):7054-7056
- [24]Charles S, Yunus S, Dubois F, et al. *Anal. Chim. Acta*, **2001,440**(1):37-43
- [25]Xavier M, Shimon W, Marcus J. *Chem. Rev.*, **2006,106**(5):1785-1813
- [26]Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/Plenum, **1999**.
- [27]Joshi B P, Park J, Lee W I, et al. *Talanta*, **2009,78**(3):903-909
- [28]Li Y, Li L Z, Pu X W, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012,22**(12):4014-4017
- [29]Fields G B, Nobel R L. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990,35** (3):161-214
- [30]Muhlradt P F, Kie B M, Meyer H. *J. Exp. Med.*, **1995,185** (11):1951-1958
- [31]Wagner B D, Mcmanus G J. *Anal. Biochem.*, **2003,317**(2):233-239
- [32]Suliman F E O, Al-Lawati Z H, Al-Kindy S M Z. *J. Fluoresc.*, **2008,18**(6):1131-1138