组蛋白乙酰化的耦合增强拉曼散射生物传感方法

龙昊旭^a 甄珍^{a,b} 唐丽娟^a 蒋健晖^{*,a}

(^a 湖南大学 化学化工学院化学生物传感与计量学国家重点实验室 长沙 410082)

(^b 深圳市宝安区疾病预防控制中心 深圳 518101)

摘要 提出了一种组蛋白乙酰化修饰检测的耦合增强拉曼散射生物传感新方法. 该方法以金纳米粒子为表面增强拉曼散射(SERS)基底, 表面修饰乙酰化组蛋白 H3 多肽为识别探针, 对甲氧基苯硫酚(4-MTP)为拉曼标记物, 制备了组蛋白乙酰化修饰检测的 SERS 纳米探针. 通过紫外可见吸收光谱与动态光散射分析, 证实了组蛋白乙酰化抗体可介导 SERS 纳米粒子发生可控组装与聚集, 使 SERS 纳米探针间发生局域电场共振耦合, 产生显著增强的 SERS 信号. 基于此, 通过待测抗原与 SERS 纳米探针对抗体的竞争性相互作用, 我们设计了组蛋白乙酰化修饰检测的竞争免疫 SERS 生物传感方法. 该法操作简便、快速、重现性好, 且肉眼即能进行可视化鉴定. 通过设计不同染料标记的 SERS 纳米探针, 该方法有望实现多种组蛋白修饰的复合检测.

关键词 乙酰化; 表面增强拉曼散射; 纳米探针; 免疫分析; 纳米粒子聚集

Surface-Enhanced Raman Scattering Based Biosensor for Histone Acetylation Detection

Long, Haoxu^a Zhen, Zhen^{a,b} Tang, Lijuan^a Jiang, Jianhui^{*,a}

(^a State Key Laboratory of Chemo/Bio-Sensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

(^b Bao'an District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518101)

Abstract A new biosensing approach is developed for the detection of histone acetylation using a surface-enhanced Raman scattering (SERS) nanoprobe constructed by decorating gold nanoparticles (AuNPs) with acetylated histone H3 peptide and 4-MTP. Using absorption spectrum and dynamic light scattering analysis, we observe acetyl-histone antibody is able to mediate a network-like assembly of SERS nanoprobes, and strong plasmonic coupling between AuNPs is thus induced with a remarkably enhanced SERS signal. Based on this finding, we report the proof-of-principle of a competitive immunoassay biosensor for acetylated histone via the competitive interactions of acetyl-histone antibody with target antigen and SERS nanoprobe. In the absence of acetylated histone, the binding of acetylated H3 peptide to its antibody triggers the assembly of the SERS nanoprobes and thus induces a strong SERS signal. The presence of target antigen, which will compete for binding sites of the antibodies, disables the binding of acetylated H3 peptide to its antibody, prevents the assembly of the SERS nanoprobes and thus merely generate a weak SERS response. The results reveal that the developed biosensor has high sensitivity for detecting the acetylated histone. A linear correlation is obtained for the SERS signals to the logarithmic acetylated histone concentration ranging from 0.5 nmol·L⁻¹ to 200 nmol·L⁻¹ with a detection limit of 0.5 nmol·L⁻¹. Additionally, the design of the biosensor allows a visual and homogeneous assay of the acetylated histone with no need of antibody labeling, which affords improved assay simplicity and throughput. This biosensor strategy may provide a convenient, rapid, highly sensitive and selective, homogeneous platform for histone acetylation assay. With the use of different Raman dyes and peptides, this biosensor might be further developed for multiplexed assays of different histone modifications.

Keywords histone acetylation; biosensor; SERS nanoprobe; immunoassay; gold nanoparticle assembly

1 引言

组蛋白是真核生物体细胞中与 DNA 结合的碱性蛋白质. 在转录调控中, 组蛋白在修饰酶的作用下, 在 N' 端会产生不同形式的修饰, 如甲基化、乙酰化、磷酸化

等^[1], 这些修饰有的能促进基因转录, 有的则可能会抑制转录^[2]. 组蛋白修饰调节基因表达作用的机制在表观遗传学的研究中, 通常被称之为“组蛋白密码”^[3]. 组蛋白修饰异常会导致各种疾病, 如癌症、糖尿病、炎症、神经性疾病和心血管疾病等^[4]. 因此, 组蛋白修饰的检

* E-mail: jianhuijiang@hnu.edu.cn

Received February 3, 2013; published April 12, 2013.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by National Natural Science Foundation of China (Nos. 21025521, 21035001, 21190041, 21205034) and National Key Basic Research Program (No. 2011CB911000).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21025521, 21035001, 21190041, 21205034)和国家重点基础研究发展计划(No. 2011CB911000)资助.

测对基因的表现遗传学研究及疾病的诊断治疗均具有重要意义。

传统的蛋白质修饰检测方法主要是酶联免疫分析技术^[5], 其原理是将待检测抗原固定在固相载体上, 加入特异性抗体反应后再加入酶标记二抗, 再通过底物显色来检测蛋白质的修饰水平。此种方法需多步分离且操作较复杂, 固相免疫反应时间也较长。

表面增强拉曼散射(SERS)具有灵敏度高, 特征性强等优点, 在生物检测领域具有广泛的应用前景^[6-9]。金纳米粒子具有独特的光学性质与电学性质, 是一种良好的 SERS 基底材料^[10], 但其提供的 SERS 信号较为有限。近年来, Van Duyne 等小组^[11-15]研究表明: 金属纳米粒子组装聚集后, 纳米粒子间由于距离很近产生强烈的电场耦合, 使得纳米粒子表面局部电场显著增强, 从而使得表面修饰的染料分子产生很强的拉曼散射信号。这种基于电磁增强的耦合增强拉曼散射现象为生物传感方法的设计提供了新的机理。但迄今尚无针对蛋白修饰进行免疫分析的报道。本文以金纳米粒子为 SERS 基底, 表面乙酰化修饰的组蛋白 H3 多肽为识别探针、对甲氧基苯硫酚(4-MTP)为拉曼标记物, 制备了一种组蛋白乙酰化修饰检测的 SERS 纳米探针。运用该探针可建立检测组蛋白乙酰化的 SERS 生物传感新方法, 该法操作简便, 快速, 重现性好, 灵敏度与选择性高, 且肉眼即能进行可视化鉴定^[16,17]。

2 结果与讨论

2.1 组蛋白乙酰化的耦合增强拉曼散射生物传感原理

实验中在 SERS 纳米探针中加入组蛋白乙酰化抗体, 抗体介导 SERS 纳米粒子发生可控组装与聚集, 使粒子之间发生局域电场耦合共振, 产生显著增强的 SERS 信号。图 1 给出了该方法的检测原理。通过在 H3-K9 乙酰化肽的 N 端加入一个半胱氨酸, 使其可通过 Au—S 键自组装而修饰于金纳米粒子表面。所采用的拉曼标记物为 4-MTP, 它也通过 Au—S 键自组装修饰于金纳米粒子的表面。在 SERS 纳米探针溶液中加入 H3-K9 乙酰化肽的抗体时, 因抗体可以特异性识别与结合乙酰化位点, 从而介导 SERS 纳米粒子形成网络状自组装聚集, 诱导粒子间的共振耦合, 使金纳米粒子表面局域电场显著增强, 这导致金纳米粒子表面等离子共振吸收光谱发生变化, 颜色改变, 且 4-MTP 的 SERS 信号增强; 而在 H3-K9 乙酰化组蛋白抗原存在的情况下, 抗原与 SERS 纳米探针竞争性地与抗体结合时, 使得 SERS 纳米探针被抗体交联的程度降低, 粒子间共振耦合减弱, SERS 信号减弱, 且减弱程度与 H3-K9 乙酰化组蛋白浓度相关。据此, 即可实现组蛋白乙酰化的定量检测。

图 2 是应用 SERS 纳米探针检测组蛋白乙酰化的 SERS 信号谱图。其中 a 是未加入抗体时纳米探针对应的 SERS 光谱, 可以看出 SERS 探针仅在 1078 cm^{-1} 与

图 1 组蛋白乙酰化的 SERS 检测原理图

Figure 1 Illustration of biosensing strategy for acetyl-modifying histone based on SERS

图 2 纳米探针检测组蛋白乙酰化的 SERS 光谱

(a) 修饰乙酰化 H3-K9 肽的 SERS 纳米探针; (b) 修饰乙酰化 H3-K9 肽的 SERS 纳米探针加入抗原后再加入抗体; (c) 修饰 H3-K9 肽(非乙酰化)的 SERS 纳米探针加入抗体; (d) 修饰乙酰化 H3-K9 肽的 SERS 纳米探针加入抗体; (e) SERS 纳米探针加入 10 倍稀释的人血清后再加入抗体

Figure 2 SERS spectra of SERS nanoprobe

(a) acetylated H3-K9 peptide-decorated SERS nanoprobe; (b) acetylated H3-K9 peptide-decorated SERS nanoprobe adding antigen followed by reacting with antibody; (c) H3-K9 peptide-decorated SERS nanoprobe reacting with antibody; (d) acetylated H3-K9 peptide-decorated SERS nanoprobe reacting with antibody; (e) SERS nanoprobe adding 10-fold dilution of human serum followed by reacting with antibody

1582 cm^{-1} 两处有较弱的 SERS 光谱带, 分别归属于 C—C 的不对称伸缩与对称伸缩振动。这一较弱的 SERS 信号说明粒子间没有产生电场耦合。d 是在 SERS 纳米探针中加入抗体反应 30 min 后的 SERS 光谱。对照 a 与 d, 可以看出在 1078 cm^{-1} 与 1582 cm^{-1} 处 SERS 信号显著增强, 表明抗体介导了 SERS 纳米粒子自组装聚集, 粒子间产生共振耦合, 导致 SERS 信号增强。b 是在先加入 H3-K9 乙酰化组蛋白抗原再加入抗体的情况下对应的 SERS 光谱, SERS 信号较无抗原时明显偏弱, 说明抗原抑制了抗体介导的 SERS 纳米探针的聚集与 SERS 信号增强, 从而证明了 SERS 信号的减弱与抗原存在的相关性。为证明方法的特异性, 我们做了两组对照实验。其中一组将 H3-K9 乙酰化肽换成无修饰的 H3-K9 肽用于

SERS 纳米探针修饰. 结果发现: 加入抗体反应 30 min 后, SERS 光谱 c 较弱, 说明抗体不会介导非修饰的 H3-K9 肽的 SERS 纳米探针组装聚集. 另一组中, 我们在 SERS 纳米探针中加入了 10 倍稀释的人血清后再加入抗体, 光谱 e 说明了其它蛋白不能抑制抗体介导 SERS 纳米探针的组装聚集. 这些控制实验表明了该方法对组蛋白乙酰化具有良好的特异性.

2.2 组蛋白乙酰化的吸收光谱分析

为了证明 SERS 信号的增强是由于抗体介导 SERS 纳米粒子组装与聚集而引起粒子间共振耦合, 我们对反应体系进行了紫外可见光吸收分析(采用日本岛津公司 UV2450 紫外分光光度计). 图 3 中 a 是未加入抗体时的修饰乙酰化 H3-K9 肽的 SERS 纳米探针的吸收光谱, d 为 SERS 纳米探针中加入抗体反应 30 min 后的吸收光谱. 可以看出加入抗体后的 SERS 纳米探针吸光度值大幅下降, 波长明显红移(从 527 nm 偏移到 588 nm), 说明抗体介导了 SERS 纳米粒子交联聚集. c 是在先加入抗原再加入抗体的情况下的吸收光谱. 比较 c 与 a, 发现吸收光谱几乎没有变化, 说明抗原抑制了抗体介导 SERS 纳米粒子的组装聚集. b 是非乙酰化 H3-K9 肽修饰的 SERS 纳米探针加入抗体反应 30 min 后的吸收光谱, 吸收光谱与 a 相比较无明显变化, 说明抗体不会介导无乙酰化的 H3-K9 肽修饰的 SERS 纳米探针聚集. e 是 SERS 纳米探针加入 10 倍稀释的人血清再加入抗体后的吸收光谱, 该光谱曲线与 a 相比也呈现明显的减色与红移, 说明其它蛋白不能抑制抗体介导 SERS 纳米探针的聚集.

图 3 SERS 纳米探针检测组蛋白乙酰化的吸收光谱

(a) SERS 纳米探针; (b) 修饰 H3-K9 肽(非乙酰化)的 SERS 纳米探针加入抗体; (c) 先加入抗原再加入抗体; (d) 加入抗体; (e) SERS 纳米探针加入 10 倍稀释的人血清后再加入抗体

Figure 3 Typical absorption spectra of SERS nanoprobe

(a) SERS nanoprobe; (b) H3-K9 peptide-decorated SERS nanoprobe reacting with antibody; (c) SERS nanoprobe adding antigen followed by reacting with antibody; (d) SERS nanoprobe reacting with antibody; (e) SERS nanoprobe adding 10-fold dilution of human serum followed by reacting with antibody

通过以上紫外可见吸收光谱分析, 我们可以看出, SERS 纳米粒子特异性地由抗体诱导交联聚集, 导致等离子共振吸收光谱减色红移, 同时 SERS 信号显著增强.

2.3 动态光散射表征

图 4 是 SERS 纳米探针的动态光散射表征图(采用英国马尔文仪器公司 Zetasizer 3000 HS 粒度分析仪). a 是 CTAB-AuNPs 的水合粒径, 检测出来为 31.5 nm. b 是 SERS 纳米探针的水合粒径, 值为 32.7 nm. c 是 SERS 纳米探针加入抗体反应 30 min 后的水合粒径, 值为 255.7 nm, 说明加入抗体后引起了 SERS 纳米粒子的交联聚集而尺寸显著增大. d 是 SERS 纳米探针加入 H3-K9 乙酰化组蛋白抗原后再加入抗体反应的水合粒径, 值为 33.7 nm, 说明加入抗原后抑制了 SERS 纳米粒子的交联聚集. 这些结果说明了 SERS 纳米粒子特异性地由抗体诱导交联聚集而导致粒径增大, 抗原可抑制抗体诱导的纳米粒子组装.

图 4 SERS 纳米探针水合粒径动态光散射图

(a) CTAB-AuNPs; (b) SERS 纳米探针; (c) SERS 纳米探针加入抗体; (d) SERS 纳米探针加入抗原后再加入抗体

Figure 4 Hydrodynamic sizes of AuNPs determined by DLS analysis

(a) CTAB-AuNPs; (b) SERS nanoprobe; (c) SERS nanoprobe reacting with antibody; (d) SERS nanoprobe adding antigen followed by reacting with antibody

2.4 组蛋白乙酰化的耦合增强拉曼散射的定量分析

图 5 是在抗体浓度固定为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下(请参见支持信息)SERS 纳米探针检测不同浓度抗原的 SERS 光谱图. 从图中可以看出随着抗原浓度的增大, 拉曼峰强度逐渐减小, 说明随着抗原浓度增大, 抗体诱导纳米粒子交联聚集的程度逐渐下降. 图 6 是在不同抗原浓度下 1078 cm^{-1} 处 SERS 峰值的工作曲线, 可以看出此处 SERS 峰强度随抗原浓度动态下降. 由其插图可见, SERS 峰强度随抗原的对数浓度呈线性负相关. 对空白溶液进行 5 次 SERS 检测, 其相对标准偏差(RSD%)为 3.6%, 可估算抗原的检出限为 $0.44 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 具有较高的灵敏度.

图5 不同浓度抗原下获得的SERS光谱

Figure 5 SERS spectra responses of the biosensing strategy to antigen of varying concentrations

图6 1078 cm⁻¹处SERS峰值随抗原浓度变化的工作曲线
插图图为SERS峰值对浓度对数的曲线

Figure 6 Corresponding peak SERS readings at 1078 cm⁻¹ versus antigen concentrations

Insert is the curve of peak SERS readings versus logarithmic antigen concentrations

3 结论

本文基于金纳米粒子交联聚集引起共振耦合表面拉曼增强机制设计了一种新型检测组蛋白乙酰化的生物传感方法。与传统的免疫分析方法相比,该法简便快速,不需抗体标记,具有较高的灵敏度与选择性,且可通过肉眼进行可视化鉴定。通过设计不同染料标记的SERS纳米探针,此法有望实现组蛋白多种修饰的同时快速检测,从而可获得组蛋白修饰相关疾病的有价值的信息。该方法也可推广用于其它多种蛋白的复合检测。

4 实验部分

4.1 多肽修饰的SERS纳米探针的制备

金纳米粒子的制备:金纳米粒子CTAB-AuNPs采用种子生长法制备^[18](请参见支持信息),制备好的纳米金粒子紫外可见光吸收最大吸收波长为527 nm,吸光

度为0.897,浓度约为3.7 nmol·L⁻¹。透射电镜表征金纳米粒子平均粒径为25 nm(请参见支持信息)。制备好的金纳米粒子于4 °C保存。

SERS纳米探针的制备:将150 μL 30 μmol·L⁻¹拉曼染料4-MTP加入到500 μL 5 nmol·L⁻¹CTAB-AuNPs溶液中,剧烈振摇2 h。再加入150 μL 50 μmol·L⁻¹H3-K9乙酰化肽序列^[19],剧烈振摇24 h,让多肽充分置换掉CTAB。其后加入9 μL 10% BSA溶液使其终浓度约为0.1%,进行纳米粒子表面封闭,静止2 h后,溶液于13000 r/min离心。吸走上清液后,将金纳米粒子分散于500 μL水中,重复三次,洗掉置换下来的CTAB、游离的多肽与拉曼标记物。最后,将制备好的SERS纳米探针分散于水中,终浓度约为5 nmol·L⁻¹,保存于4 °C。

4.2 组蛋白H3乙酰化的耦合增强拉曼散射检测

于25 μL SERS纳米探针(5 nmol·L⁻¹)溶液中,加入6 μL 100 mmol·L⁻¹NaAc-HCl缓冲液(pH 7.2)、25 μL超纯水、2 μL给定浓度的人重组乙酰化组蛋白抗原,摇匀后加入2 μL乙酰化H3-K9抗体(抗体终浓度为50 nmol·L⁻¹)。反应30 min后,取2 μL体积反应液进行拉曼检测(采用英国Renishaw公司激光共聚焦倒置显微拉曼光谱仪,以632 nm的HeNe激光作为激发光,曝光时间为30 s)。

References

- [1] Bhaumik, S. R.; Smith, E.; Shilatifard, A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1008.
- [2] Li, B.; Carey, M.; Workman, J. L. *Cell* **2007**, *128*, 707.
- [3] Jenuwein, T.; Allis, C. D. *Science* **2001**, *293*, 1074.
- [4] Selvi, B. R.; Mohankrishna, D. V.; Ostwal, Y. B.; Kundu, T. K. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1799*, 810.
- [5] Mullenax, C. J.; Araujo, F. G.; Erlich, H. A.; Remington, J. S. *J. Immunol.* **1983**, *131*, 977.
- [6] Pal, A.; Isola, N. R.; Alarie, J. P.; Stokes, D. L.; Vo-Dinh, T. *Faraday Discuss.* **2006**, *132*(1), 293.
- [7] Braun, G.; Lee, S. J.; Dante, M.; Nguyen, T. Q.; Moskovits, M.; Reich, N. J. *Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(20), 6378.
- [8] Banholzer, M. J.; Qin, L.; Millstone, J. E.; Osberg, K. D.; Mirkin, C. A. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*(6), 838.
- [9] Grubisha, D. S.; Lipert, R. J.; Park, H. Y.; Driskell, J.; Porter, M. D. *Anal. Chem.* **2003**, *75*(21), 5936.
- [10] Link, S.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*(40), 8410.
- [11] Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van-Duyne, R. P. *Nat. Mater.* **2008**, *7*(6), 442.
- [12] Camden, J. P.; Dieringer, J. A.; Wang, Y. M.; Masiello, D. J.; Marks, L. D.; Schatz, G. C.; Van-Duyne, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(38), 12616.
- [13] Willets, K. A.; Van-Duyne, R. P. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*(1), 267.
- [14] Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. *Nano Lett.* **2008**, *8*(12), 4347.
- [15] Qian, X. M.; Zhou, X.; Nie, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14935.
- [16] Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Schatz, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4640.
- [17] Zhao, W.; Brook, M. A.; Li, Y. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2363.
- [18] Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Langmuir* **2001**, *17*, 6782.
- [19] Levy, R.; Thanh, N. T. K.; Doty, R. C.; Hussain, I.; Nichols, R. J.; Schiffrin, D. J.; Brust, M.; Fernig, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10076.

(Cheng, F.)