# 荧光光谱法研究纳米硫化锌与牛血 清白蛋白的相互作用

# 陈 $t^{1*}$ ,吴都督<sup>2</sup>,张 爽<sup>3</sup>,林 晓<sup>2</sup>,龙烁杭<sup>2</sup>,施志海<sup>2</sup>,吴锐彬<sup>2</sup>

(1. 广东医学院 分析中心,广东 东莞 523808; 2. 广东医学院 药学院,广东 东莞 523808;3. 广东医学院 医学检验学院,广东 东莞 523808)

摘 要:采用水相法合成了 ZnS 纳米颗粒,通过 XRD 及 TEM 技术对纳米 ZnS 进行了表征,结果表明纳米 ZnS 的粒径约为 7~8 nm。利用荧光光谱考察了纳米 ZnS 与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用,结果显示,两者 的相互作用可导致 BSA 内源荧光猝灭,推测其猝灭机理为静态猝灭,结合常数  $K_a = 1.73 \times 10^5$  L•mol<sup>-1</sup>,结 合位点数 n = 0.83,纳米 ZnS 与 BSA 可形成 1 个结合位点。

关键词:纳米硫化锌;牛血清白蛋白;荧光光谱;相互作用;静态猝灭

中图分类号: 0657.1; 0629.73 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)11-1272-04 doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.11.013

Investigation on Interaction of Bovine Serum Albumin with ZnS Nanoparticles by Fluorescence Spectroscopy

CHEN Zhi^\* , WU Du-du² , ZHANG Shuang³ , LIN Xiao² , LONG Shuo-hang² , SHI Zhi-hai² , WU Rui-bin²

(1. Center of Analysis , Guangdong Medical College , Dongguan 523808 , China; 2. School of Pharmacy , Guangdong Medical College , Dongguan 523808 , China; 3. School of Laboratory Medicine ,

Guangdong Medical College , Dongguan 523808 , China)

Abstract: ZnS nanoparticles was synthesized using zinc acetate and sodium sulfide as starting materials in water solution. The morphology and crystal phase of nano-ZnS were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and powder X-ray diffraction (XRD). The interaction of nanoparticles and bovine serum albumin (BSA) was investigated by fluorescence spectroscopy in pH 7. 0 Tris – HCl buffer. The result showed that the interaction between BSA and ZnS nanoparticles could resulted in the endogenous fluorescence quenching of BSA, which belonged to a static quenching mechanism. The quenching rate constant was  $1.88 \times 10^{14} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , the binding constant ( $K_a$ ) and binding site (n) were  $1.73 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  and 0.83, respectively. Key words: nano-ZnS; bovine serum albumin (BSA); fluorescence spectroscopy; interaction; static quenching

近年来,生理环境下纳米粒子与蛋白质之间的相互作用研究已成为新的热点<sup>[1-3]</sup>。相关研究结果 不仅可为纳米粒子作为探针在生物医药领域应用提供理论支撑,同时还间接研究了纳米粒子应用于生 物医学领域后可能带来的毒理作用等<sup>[4]</sup>。牛血清白蛋白(BSA)是由 582 个氨基酸残基组成的单肽链蛋 白质,其氨基酸序列与人血清白蛋白(HSA)非常类似。由于 BSA 具有广泛的结合能力,能与许多内源 及外源性化合物结合,因此常作为模型蛋白用于体外外源物质与蛋白质之间的相互作用研究<sup>[5-8]</sup>。

纳米硫化锌(ZnS)是一种非常重要的半导体材料,由于具有优良的光学特性,在光致发光、电致 发光、磷光体、传感器、红外窗口材料、光催化等领域有着广泛的应用<sup>[9]</sup>。此外,与传统的有机染料 相比,纳米 ZnS 具有发射光谱窄、峰形对称、光化学稳定、荧光寿命长、荧光量子产率高等优点,近 年来已有不少学者将其作为生物荧光探针应用于生物医药领域<sup>[10-12]</sup>。但目前纳米 ZnS 在生物方面的应

收稿日期: 2011-06-17; 修回日期: 2011-07-10

基金项目: 2010年广东省教育厅育苗工程资助项目; 广东省卫生厅资助项目(B2009190); 东莞市高等院校科研机构资助项目 (200910815254)

<sup>&</sup>lt;sup>。</sup>通讯作者: 陈 稚,硕士,讲师,研究方向: 药物分析和生化研究,Tel: 0769-22896376,E-mail: cz122@126. com

用主要集中在蛋白的检测方面,而对纳米 ZnS 与 BSA 相互作用的研究未见文献报道。由于此类研究可 为纳米材料的临床应用及生物安全性评价等方面提供更多的依据和参考,因而具有重要的理论意义。 本文通过水相合成法制备了纳米 ZnS,同时利用荧光光谱考察了纳米 ZnS 与 BSA 的相互作用,并探讨 了其相互作用机理。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日立 H 600 透射电镜仪、F-4600 日立荧光光谱仪(日本日立集团); D/max-yA 型 X 射线衍射仪(日本理学株式会社)。

牛血清白蛋白(生化试剂,上海丽珠东风生物技术有限公司);三羟甲基氨基甲烷(中国医药集团 上海化学试剂公司),醋酸锌、硫化钠(天津科密欧化学试剂公司),无水乙醇、丙酮、氢氧化钠、氯 化钠(广东番禺化学试剂厂)均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

1.2 纳米硫化锌的合成

将 20 mL 0.2 mol • L<sup>-1</sup>的 Zn ( CH<sub>3</sub>COO )<sub>2</sub> 加至 250 mL 三颈烧瓶中,用 NaOH 调节至 pH 9.0,在剧 烈搅拌的条件下,将预先配制好的 20 mL 0.5 mol • L<sup>-1</sup>的 Na<sub>2</sub>S 溶液逐滴加入上述体系中反应 12 h,将 混合液转移至 100 mL 的晶化釜中,于 100 ℃下晶化 24 h 后,将产品用无水乙醇和丙酮洗涤,真空干燥 后即得纳米硫化锌。

1.3 纳米硫化锌的表征

透射电镜(TEM)测试:将少量样品放入称量瓶内,乙醇作分散剂,超声振荡20 min 后,用洁净的 滴管取一滴于铜网上,干燥后进行观察,操作电压为200 kV;X-射线衍射(XRD)测试:使用 CuKα 辐 射(λ = 0.154 2 nm),金属 Ni 滤波,石墨单色器,电压 40 kV,电流 30 mA,闪烁记数器记录强度。 1.4 纳米硫化锌与 BSA 的相互作用

牛血清白蛋白和纳米 ZnS 均用 0.05 mol •  $L^{-1}$  pH 7.0 的三羟甲基氨基甲烷(Tris) 缓冲溶液配制, 以 0.10 mol •  $L^{-1}$  NaCl 维持离子强度。

荧光光谱测定:在 28 ℃下,移取 2.0 mL 1.0×10<sup>-6</sup> mol・L<sup>-1</sup> BSA 溶液于 1 cm 石英池中,用微量进 样器逐次加入 1.0×10<sup>-6</sup> mol・L<sup>-1</sup>纳米 ZnS 水溶液,每次加入后混合均匀,静置 5 min,以 290 nm 为激发 波长,在荧光光谱仪上记录 220~550 nm 波长范围内的发射光谱,狭缝为 2 nm,扫速为 2 400 nm/min。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 纳米硫化锌的表征

2.1.1 纳米硫化锌的透射电镜图 纳米硫化锌的 透射电镜图如图 1 所示。由图可见,本文所制备的 纳米硫化锌为球形颗粒,通过 Photoshop 软件计算 其粒径约为 8 nm。

2.1.2 纳米硫化锌的 XRD 图 纳米 ZnS 的 XRD 图如图 2 所示。由图可见,纳米 ZnS 在 28.9°、 48.5°、57.4°分别出现 3 个较尖锐的衍射峰。该 3 个衍射峰分别对应于 ZnS 的(311)、(220)和(111) 3 个晶面,与文献[13]一致。而根据谢乐公式D = k[ $\lambda/(\beta \cos \theta')$ ]亦可计算样品的粒径,其中 D 为晶 体粒径; k = 0.89;  $\lambda$  为衍射峰的波长( $\lambda = 0.154$  2 nm);  $\beta$  为半峰宽;  $\theta' = 2\theta(\theta$  为衍射峰的角 度)<sup>[14]</sup>。本文以 57.4°(2 $\theta$ )为 $\theta'$ ,计算出样品的颗 粒大小约为7 nm,与 TEM 的实验结果基本一致。



图 1 纳米硫化锌的透射电镜图 Fig. 1 TEM image of ZnS nanoparticles

2.2 纳米硫化锌与 BSA 的相互作用

2.2.1 BSA 的荧光猝灭效应 蛋白质分子中色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)可作为内源荧光探针检测蛋白质的构象变化。A 类蛋白质(不含Trp,只含Phe 和 Tyr)的荧光光谱主要表现出Tyr 的特征,最大发射波长约为304 nm。B 类蛋白质(含有Trp)的荧光光谱则主要表现出Trp 的特征,最大荧光发射在310~360 nm 之间。处于蛋白质分子表面的Trp 残基具有350~353 nm 的荧光发射峰,而包埋于蛋白质内部Trp 残基的荧光发射峰在326~342 nm 之间,处于非极性环境Trp 残基的荧光发射峰在310~324 nm 附近<sup>[15]</sup>。

BSA 由于含有 Trp、Tyr 和 Phe 残基而具有较强的内源荧光;而纳米 ZnS 溶液的荧光强度很弱,对 BSA 的荧光发射光谱无影响。按照"1.4"实验方 法扫描实验体系的荧光光谱(见图 3)。由图 3 可 见,BSA 在 350 nm 附近有 1 个强的荧光发射峰, 分析是由 BSA 分子表面的 Trp 残基产生。随着纳米 ZnS 浓度的增加,BSA 发射光谱的峰位和峰形基本 不变,但其内源荧光呈规律性猝灭,荧光强度逐渐 降低,表明 BSA 与纳米 ZnS 之间发生了相互作用。 2.2.2 纳米硫化锌对 BSA 的荧光猝灭机理 如果 荧光体 BSA 与猝灭体配合物由于热运动等发生碰 撞而引起 BSA 的荧光猝灭,则这种动态猝灭服从 Stern – Volmer 方程:

$$I_{\rm F}^0/I_{\rm F} = 1 + K_{\rm q} \bullet \tau_0 [Q] = 1 + K_{\rm D} [Q]$$
(1)

其中 $I_{\rm F}^{0}$ 为无猝灭体时荧光体的荧光强度, $I_{\rm F}$ 为加入猝灭体后的荧光强度, $K_{\rm q}$ 为双分子猝灭常 数(L•mol<sup>-1</sup>•s<sup>-1</sup>), [Q]为猝灭体的浓度(即纳米 ZnS 的浓度, mol•L<sup>-1</sup>), $\tau_0$ 为无猝灭体时荧光体 的荧光寿命(s), $K_{\rm D}$ 为 Stern – Volmer 常数(L• mol<sup>-1</sup>•s<sup>-1</sup>)。根据公式(1),将 350 nm 处的 $I_{\rm F}^{0}/I_{\rm F}$ 对所加入配合物的总浓度[Q]作图,得到该配合物 对 BSA 的 Stern – Volmer 猝灭曲线(见图 4): $I_{\rm F}^{0}/I_{\rm F}$ = 1.884 3 × 10<sup>6</sup> [Q] + 1.066 4, r = 0.995 9。该曲线 的斜率即为配合物的 $K_{\rm D}$ 值。由于生物分子的荧光 寿命 $\tau_0$ 约为 10<sup>-8</sup> s,因此可计算得到配合物的表观 猝灭常数 $K_{\rm q}(K_{\rm q} = K_{\rm D}/\tau_0)$ 为 1.88 × 10<sup>14</sup> L•mol<sup>-1</sup>• s<sup>-1</sup>。各种猝灭剂对生物分子的最大扩散碰撞猝灭 常数约为 2.0 × 10<sup>10</sup> L•mol<sup>-1</sup>•s<sup>-1[16]</sup>,而本实验所 得的表现猝灭常数  $K_{\rm p}$ 远太于其扩散控制的猝灭常数



图 2 纳米硫化锌的 XRD 图





图 3 纳米 ZnS 浓度对 BSA 荧光光谱的影响 Fig. 3 Fluorescence spectra of BSA at various concentrations of ZnS nanoparticles  $c_{ZnS}(a-g) : 0.0, 1.0, 1.6, 2.3, 3.3, 3.8, 4.1$  $(\times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}); c_{RSA} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 



图 4 BSA 与纳米 ZnS 作用的 Stern – Volmer 方程曲线 Fig. 4 Stern – Volmer quenching plot of BSA with ZnS nanoparticles

得的表观猝灭常数 K<sub>q</sub> 远大于其扩散控制的猝灭常数,推断其猝灭过程不可能是由分子扩散和碰撞所引起的动态猝灭,而是由于纳米 ZnS 与 BSA 之间发生相互作用而引起的静态猝灭。

2.2.3 纳米硫化锌与 BSA 的结合位点数 n 及结合常数 K<sub>a</sub> 对于静态猝灭,由荧光强度与猝灭剂的关系,可求得荧光分子与猝灭剂的结合常数。设 BSA 有 n 个相同且独立的结合位点,则有:

1275

 $\lg [(I_{\rm F}^0 - I_{\rm F}) / I_{\rm F}] = \lg K_{\rm a} + n \lg [Q]$  (2)

以  $\lg [(I_F^0 - I_F) / I_F]$ 对  $\lg [Q]$ 作图,应为一条直 线,直线斜率为结合位点数 n,而由直线截距可求 得配合物与 BSA 结合的稳定常数  $K_a$  值 (见图 5)。 由图 5 的数据,求得结合常数  $K_a = 1.73 \times 10^5$  L• mol<sup>-1</sup>,结合位点数 n = 0.83。计算结果表明纳米 ZnS 与 BSA 可形成 1 个结合位点,且结合常数较 大,说明两者之间具有较强的结合力,纳米 ZnS 可 在体内由蛋白质储存或输运。



## 3 结 论

本文采用水相法合成了 ZnS 纳米颗粒,并通过 XRD 和 TEM 表征,计算出 ZnS 纳米颗粒的粒径约

图 5  $\lg [(I_F^0 - I_F) / I_F] 与 \lg [Q] 关系曲线图$ 

Fig. 5 Relationship between  $\lg [(I_F^0 - I_F)/I_F]$  and  $\lg [Q]$ 

为 7~8 nm。同时在 pH 7.0 的条件下,用荧光光谱法研究了纳米 ZnS 与 BSA 结合反应的特征。该纳米 颗粒对 BSA 具有荧光猝灭作用,推测其猝灭过程为静态猝灭,结合位点数 n = 0.83,具有 1 个结合位点;其结合常数为 1.73 ×  $10^5$  L•mol<sup>-1</sup>,与 BSA 具有较强的相互作用,能够结合形成较稳定的配合物。

#### 参考文献:

- [1] Dong F, Liu JG, Yang YX, Liang JG, Han HY. Chin. J. Light Scattering (董飞,刘江国,杨逸仙,梁建功,韩 鹤友. 光散射学报), 2010, 22(1): 66-71.
- [2] Dzagli M M, Canpean V, Iosin M, Mohou M A, Astilean S. J. Photochem. Photobiol. A, 2010, 215(1): 118-122.
- [3] Liang J, Cheng Y, Han H. J. Mol. Struct., 2008, 892(1/3): 116-120.
- [4] Xu L, Guo Y, Xie R G, Zhuang J Q, Wang L Y, Yang W S, Li T J. J. Funct. Mater. Devices (徐力,郭轶,解仁 国,庄家骐,王连英,杨文胜,李铁津.功能材料与器件学报), 2003, 9(2): 201-204.
- [5] Li X X, Zhao W Q, Miao L X, Liu Q R. J. Instrum. Anal. (李晓霞,赵文琴,苗力孝,刘启瑞. 分析测试学报), 2010, 29(11): 1126-1131.
- [6] Shang Y H, Sun J J, Liu J. Chem. Res. (尚永辉, 孙家娟, 刘静. 化学研究), 2011, 22(2): 1-3.
- [7] Zhao F, Huang C F, Liang H, Xiong W, Chen Y, Hu X Y. Chin. J. Anal. Chem. (赵芳, 黄超锋, 梁慧, 熊伟, 陈 燕, 胡欣怡. 分析化学), 2011, 39(3): 401-404.
- [8] Hao J, Zhang A P, Huang Q, Yang JY, Zheng M D, Mao H S. J. Instrum. Anal. (郝娟, 张爱平, 黄茜, 杨锦艳, 郑茂东, 毛红胜. 分析测试学报), 2010, 29(11): 1173-1179.
- [9] Li Y B, Xu Y S. J. Synth. Cryst. (李玉斌,徐运生.人工晶体学报), 2003, 32(5): 508-511.
- [10] Zhu C Q , Zhao D H , Chen J L , Li Y X , Wang L Y , Zhou Y Y , Zhou S J , Wu Y Q. Anal. Bioanal. Chem. , 2004 , 378(3): 811-815.
- [11] Wang L Y , Kan X W , Zhang M C , Zhu C Q , Wang L Analyst , 2002 , 127(11): 1531-1534.
- [12] Wang LY, Zhao CQ, Zhu CQ, Wang L. Spectrosc. Spectral Anal. (汪乐余,赵长庆,朱昌青,王伦. 光谱学与光 谱分析), 2004, 24(1): 98-101.
- [13] Li J P, Zhai S R, Liu Y, Xu Y, Wu D, Sun Y H. Acta Chim. Sin. (李军平, 翟尚儒, 刘勇, 徐耀, 吴东, 孙予 罕. 化学学报), 2004, 62(22): 2273-2276.
- [14] Idowu M , Lamprecht E , Nyokong T. J. Photochem. Photobiol. A , 2008 , 198(1): 7-12.
- [15] Huang X H, Liu X, Li J, Liu K W. J. Sichuan Univ.: Nat. Sci. Ed. (黄新河, 刘鑫, 李佳, 刘克武. 四川大学学报: 自然科学版), 2005, 42(2): 377-381.
- [16] Liu X F, Xia Y M, Fang Y, Zou L, Liu L L. Acta Chim. Sin. (刘雪锋,夏咏梅,方云,邹鲁,刘玲玲. 化学学报), 2004, 62(16): 1484 1490.