

荧光光谱法研究 $\text{Hg}(\text{II})$ 与牛血清白蛋白的相互作用

韩木先 邹欣平 李跃勤

(湖北师范学院化学与环境工程学院 湖北省黄石市磁湖路 82 号 435002)

摘 要 在 pH 为 7.15、离子强度为 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液条件下, 采用荧光光谱法研究了 $\text{Hg}(\text{II})$ 与牛血清白蛋白的相互作用。实验结果表明, $\text{Hg}(\text{II})$ 对牛血清白蛋白的荧光强度猝灭机理是一种静态猝灭, 且 Hg^{2+} 与牛血清白蛋白结合的位点数为 2, 表观络合常数(K)为 $2.468 \times 10^{10} \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ 。

关键词 荧光光谱法, 牛血清白蛋白, $\text{Hg}(\text{II})$ 。

中图分类号: O 657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2009)02-0173-04

1 前言

蛋白质是生命活动的重要组成物质, 血清白蛋白是哺乳动物体内参与多种内源性和外源性物质的存储和转运的蛋白, 具有十分重要的生理功能。牛血清白蛋白(简称 BSA)是从牛血浆中提取的血清蛋白, 含有 2 个色氨酸和 19 个酪氨酸残基, 具有荧光发射性质, 因而具有内源荧光。天然环境中存在的众多物质对蛋白质的溶解度、变性行为等都有很大的影响^[1]。汞类物质会影响生命活动中蛋白质的结构, 可通过胃肠道、皮肤和肺吸收, 经血液循环而储存在肝、肾、脾脏和骨骼中, 只能由尿、粪便、汗液、唾液等逐渐排出体外。残留在体内的汞类物质对人体健康有极大的危害。研究 $\text{Hg}(\text{II})$ 与牛血清白蛋白的相互作用, 在医学上对疾病的诊断疗效的观察提供有价值的资料及数据^[2], 对生命科学、环境保护等领域的研究有着实际的意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

970CRT 荧光分光光度计(上海分析仪器总厂), pH-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂), AG245 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司), 万宝冰箱, 石英自动双重纯水蒸馏器(江苏金坛)。

$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 储备液($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$), 室温保存。Tris(三羟甲基氨基甲烷)-HCl 缓冲溶液: 在 pH 计上配制一系列 pH 为 7.15 Tris-HCl 缓冲溶液, 0—4 保存。BSA 储备液($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), 0—4 保存。本实验所用试剂均为分析纯, 用水为二次蒸馏水, 经检验均无荧光本底值。

2.2 实验方法

在 11 支比色管中, 依次加入 2.00mL pH 为 7.15 的 Tris-HCl 缓冲溶液、1.00mL 0.15 mol/L NaCl 溶液、1.00mL $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ BSA 溶液, 最后在 10 支比色管中分别加入不同量的

湖北师范学院研究生启动基金(2007D37)

联系人, 手机: (0)13597644595; E-mail: nicexxh@163.com

作者简介: 韩木先(1977—), 女, 湖北省黄冈市人, 助教, 硕士, 主要从事光谱分析及其他仪器分析方法的研究和应用。

$1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ $\text{Hg}(\text{II})$ 标准溶液, 用蒸馏水定容为 10 mL , 摇匀。静置 3 h , 以 285 nm 为激发波长 (λ_{ex})、 345 nm 为发射波长 (λ_{em}) 测定其荧光猝灭光谱图。设定灵敏度为 3, 狭缝通带宽 $E_{\text{x}}/E_{\text{M}} = 10 \text{ nm}$ 。

3 结果与讨论

3.1 体系光谱特征

$\text{Hg}(\text{II})$ 是一种软路易斯酸, 易得电子, 而 BSA 中氨基酸残基带正电荷, $\text{Hg}(\text{II})$ 易与 BSA 因静电作用而结合。以 285 nm 为激发波长, 设定灵敏度为 3, 狭缝宽 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$, 在 345 nm 处 BSA 有最大荧光特征发射峰。加入 $\text{Hg}(\text{II})$ 后, 345 nm 处 BSA 的最大荧光峰的位置不变, 由于 $\text{Hg}(\text{II})$ 与 BSA 中氨基酸残基的相互作用, 使 BSA 中产生内源荧光的成分减少, 因而荧光强度明显降低。

3.2 最佳反应条件的测定

3.2.1 缓冲介质及 pH 的影响

考察了 $\text{NaOH-K}_2\text{HPO}_4$ 、 Tris-HCl 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 三种缓冲介质在 $\text{pH } 6.8\text{--}7.6$ 范围内对体系荧光强度的影响。实验表明: 在 $\text{pH } 7.15$ 的 Tris-HCl 缓冲介质中, 缓冲溶液用量为 2.00 mL 时, 其相对荧光强度最大。实验选用加入 $\text{pH } 7.15$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液 2.00 mL 。

3.2.2 离子强度的影响

考察了离子强度对体系荧光强度的影响。结果发现: 加入 NaCl 溶液后, 体系比未加入 NaCl 溶液易达到稳定平衡; 且当 NaCl 溶液的浓度为 0.15 mol/L 时, 体系在反应 2 h 内比较稳定, 且荧光分析灵敏度最高。因此, 选用 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液。

3.2.3 反应时间的影响

以 $\text{pH } 7.15$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液为反应介质, 加入 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液, 配制 $n_1(\text{Hg}^{2+}) : n_2(\text{BSA}) = 2$ 的溶液, 测定反应达到稳定的平衡态时间。结果表明: 体系反应 3 h 后, 达到稳定的平衡态。最佳测定时间是在配好溶液 3 h 后测定相对荧光光谱。

3.3 汞对 BSA 荧光强度的猝灭机理

在最佳实验条件下, 测量 $\text{Hg}(\text{II})$ 浓度的改变对 BSA 荧光强度的影响, 结果见表 1。 F_0

为 BSA 在 345 nm 处的荧光强度, F 为加入 Hg^{2+} 后 345 nm 处的荧光强度。

表 1 $\text{Hg}(\text{II})$ -BSA 系列溶液荧光强度的测定

$n_1 : n_2$	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	4.5	5.0
$\lambda_{\text{em}} (\text{nm})$	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345
F	388	373	365	364	358	356	355	353	352	349
F_0/F	1.000	1.040	1.063	1.066	1.084	1.090	1.093	1.099	1.102	1.112

由表 1, 以 345 nm 处荧光峰的相对强度 F_0/F 为纵坐标, 以 $n_1(\text{Hg}^{2+}) : n_2(\text{BSA})$ 为横坐标, 得到图 1。由图 1 可以看出, 在达到最大荧光猝灭前随 Hg^{2+} 的加入, 荧光强度的变化成良好的线性关系。若将此过程按动态猝灭处理则符合 Stern-Volmer 方程^[3,4]:

$$\frac{F_0}{F} - 1 = K_q \times \tau_0 [Q] = K_D [Q]$$

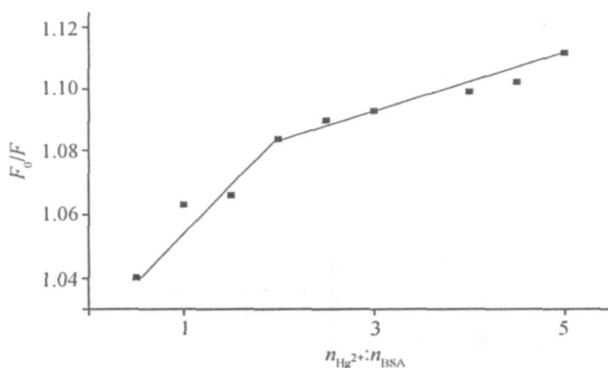


图 1 Hg^{2+} 浓度对 BSA 荧光强度的影响

其中: F 和 F_0 ——分别为存在和不存在猝灭剂 Hg(II) 的荧光强度; K_q ——双分子表观猝灭常数; τ_0 ——猝灭剂不存在时荧光体的荧光寿命; $[Q]$ ——猝灭剂浓度; K_D ——Stern-Volmer 猝灭常数。直线斜率表示荧光猝灭过程中的速率常数, 并可求得速率常数为 $2.70 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 。生物大分子的最大动态猝灭过程速率常数 $< 100 \text{ L/mol}$, 故可初步确定 Hg(II) 与 BSA 相互作用的荧光发生猝灭是由静态猝灭引起的。

在一般情况下, 动态猝灭和静态猝灭可依据不同温度条件下的结果得以区别。为了进一步考察 Hg^{2+} 与 BSA 相互作用的荧光猝灭原因, 在最佳实验条件下, 考察了温度变化对 BSA 荧光强度的影响以及对 Hg^{2+} 与 BSA 系列溶液荧光性能的影响, 见图 2。

由图 2 可知: 随温度的升高, Hg(II)-BSA 体系的荧光强度下降, 并可求得其猝灭常数依次为: $1.01 \times 10^7 \text{ L/mol}$, $0.92 \times 10^7 \text{ L/mol}$, $0.84 \times 10^7 \text{ L/mol}$, $0.69 \times 10^7 \text{ L/mol}$, $0.33 \times 10^7 \text{ L/mol}$ 。进一步证实了 Hg^{2+} 与 BSA 相互作用的荧光猝灭随温度的升高 BSA 的荧光强度降低。BSA 是蛋白质分子, 随温度的升高蛋白质发生变性, 且在高温下分子碰撞失去能量及易于发生内部转化和系间交叉, 所导致的结果是荧光强度降低。

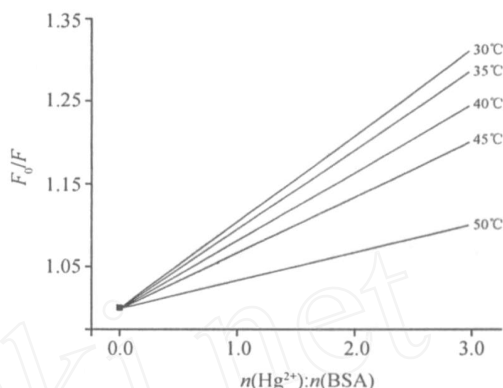


图 2 温度对 Hg^{2+} -BSA 体系的荧光强度的影响

F_0 ——BSA 在 345nm 的荧光强度;

F ——加入 Hg^{2+} 后在 345nm 处的荧光强度;

$n(\text{Hg}^{2+}) : n(\text{BSA})$ 为 Hg^{2+} 与 BSA 的物质的量的比。

3.4 汞与 BSA 相互作用的结合位点数和表观络合常数

由图 1 知, Hg^{2+} 对 BSA 的荧光猝灭效应在 $n_1(\text{Hg}^{2+}) : n_2(\text{BSA}) = 2$ 时出现明显的拐点, 这表明 BSA 应有两类以上的与 Hg^{2+} 结合部位, 第一类强结合部位能结合两个金属离子, 向溶液中加入 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 溶液, 发现在 345nm 处荧光峰强度减弱。从图 1 知, 在物质的量之比为 2 时出现转折, 说明 BSA 应有两类以上的与 Hg^{2+} 结合点, 强结合点数为 2, 即形成了 $\text{Hg}_2 \cdot \text{BSA}$ 配合物, 反应的物质质量之比为 2 : 1。在 $n_1(\text{Hg}^{2+}) : n_2(\text{BSA}) \leq 2$ 时, 相对荧光强度 F_0/F 的变化与 Hg^{2+} 浓度呈线性关系, 则有:



则(1)式的络合常数为

$$K = \frac{[\text{Hg}_2\text{BSA}]}{[\text{Hg}^{2+}]^2 \cdot [\text{BSA}]}$$

在室温下, pH 7.15、离子强度为 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液条件下, 通过荧光法测得 Hg^{2+} 与 BSA 结合的表观络合常数 $K = 2.468 \times 10^{10} \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ 。

参考文献

- [1] Kent H, Liley T H, Milburn P J *et al*. Interactions between Terminally Substituted Amino Acids in an Aqueous and a Non-Aqueous Environment: Enthalpic Interaction Coefficients in Water and in N,N-Dimethylformamide at 25 °C [J]. *J. Solution Chem.*, 1985, 14: 101—105
- [2] 管正大. 医学检验临床意义手册[M]. 北京: 人民军医出版社, 1994: 6
- [3] 吴根华, 汪春华. 荧光法研究 Pb^{2+} 与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(2): 246—248
- [4] 姚武, 高峰, 王伦. 依诺沙星与牛血清白蛋白相互作用的荧光法研究[J]. 分析测试学报, 2005, 24(1): 76—79

Research on the Interaction between Hg(II) and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy

HAN Mu-Xian ZOU Xin-Ping LI Yue-Qin

(College of Chemistry and Environmental Engineering, Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 435002, P. R. China)

Abstract The interaction between Hg(II) and Bovine Serum Albumin (BSA) was investigated by Fluorescence Spectroscopy in pH = 7.15 buffer solution and ionic strength of 0.15 mol/L sodium chloride solution. It was proved that static quenching exists between Hg(II) and BSA. The results showed that the number of binding sites is $n = 2$ and the combination constant is $K = 2.468 \times 10^{10} \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$.

Key words Fluorescence Spectroscopy, Bovine Serum Albumin, Hg(II).

欢迎您投稿“高效、保质”的中文核心期刊 《光谱实验室》

这是您的发明、发现获得“优先权”的可靠保障!

发表周期多数(50% - 75%)为 4—8 个月,

少数(20% - 45%)为 1—4 个月,个别(0 - 7%)为 15—30 天

及时发表科技论文,是尽早实现其社会效益的前提,也是作者创造性劳动得到尊重、为在世界上取得“优先权”的可靠保障,因为发明、发现的“优先权”通常是以出版时间为准的。因此,本刊把尽快发表作者的论文,视为自己的神圣职责。

确保论文质量是论文早日发表的条件。作者发表论文总是要反映自己在工作有所发明、有所发现和有所创造的成绩,而不是去暴露自身的“缺欠”和“毛病”;换言之,作者发表论文总是要为自己争“光”,而不是自己要出“丑”。因此,作者投稿之前,除了自己要反复检查外,一定要多请您周围的同事、专家挑“毛病”,把“毛病”消灭在投稿之前,再投本刊才能发表得快。如果本刊挑出毛病,再请作者修改,反复“折腾”,不仅消耗双方精力,而且必然延长发表时间。保证质量的基本要求就是论文要做到“齐、清、定”。“齐”即全稿包括表、图和照片等齐全;“清”即文字图片打印(书写)清楚,不得有模糊不清的文字、图片和数字,段落要分明,便于排版和校对;“定”即做到稿件内容完整,在编辑过程中无须增删修改。

来稿请用 Word 或北大方正排版,用电子邮件发到本部电子信箱[E-mail: (1) gpssys@263.net; (2) gpssys@public.sti.ac.cn; (3) gpss@chinajournal.net.cn; (4) gpssys@periodicals.net.cn]。为避免某一电子信箱的服务器发生故障而延误收稿,建议作者向本刊两个或两个以上信箱同时发送电子邮件。

本刊收到作者来稿后,都会在 16 小时(遇公休日顺延)内发出“关于收到稿件的通知”。因此,作者发送稿件后 5 日以上都没有消息,一定要及时来电查询。

一篇论文出版,常常需要反复沟通“作者→编辑部→审者→编辑部→作者”之间的联系,其中与作者的联系是最重要的一环,一旦脱节,必然中断编辑过程。因此作者来稿时,务必将联系人的详细地址、办公室电话、手机号码、传真号码和电子信箱等(通讯方式要尽可能全)告诉编辑部,以便能与您及时联系。否则,由此而耽误出版由作者自己负责。

《光谱实验室》编辑部