

荧光法研究偏钒酸钠与牛血清白蛋白的相互作用

边贺东 李 梅 于 青 梁 宏*
(广西师范大学化学化工学院, 桂林 541004)

摘要: 本文用荧光光谱和紫外可见吸收光谱研究了在模拟人体生理条件下, 偏钒酸钠与牛血清白蛋白(BSA)结合反应的特征, 研究了紫外灯(253.7 nm)照射对偏钒酸钠与 BSA 结合的影响。紫外吸收光谱显示, 加入偏钒酸钠后, 牛血清白蛋白的紫外吸收降低, 表明偏钒酸钠与 BSA 形成了缔合物。荧光猝灭光谱显示偏钒酸钠对牛血清白蛋白有较强的荧光猝灭作用, 荧光猝灭机理符合静态机制。缔合物的稳定常数分别为: $K_s=0.357 \times 10^4$ (25 °C), $K_s=0.667 \times 10^4$ (30 °C), $K_s=1.437 \times 10^4$ (35 °C)。Forster 偶极-偶极非辐射能量转移机理确定了偏钒酸钠在牛血清白蛋白中与第 214 位色氨酸残基之间的距离 $R=1.069\ 5\ \text{nm}$ (25 °C), $R=1.078\ 2\ \text{nm}$ (30 °C), $R=1.080\ 6\ \text{nm}$ (35 °C)。

关键词: 荧光光谱; 紫外可见吸收光谱; 牛血清白蛋白; 偏钒酸钠

中图分类号: O614.51+1; O614.112

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)05-0845-06

Studies on the Interaction between NaVO_3 and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Method

BIAN He-Dong LI Mei YU Qing LIANG Hong

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: The interaction between NaVO_3 and bovine serum albumin (BSA) was investigated by absorption spectrometry and fluorescence measurement. The binding constants were also obtained and the effect of UV C(253.7 nm) exposure on the values of binding constants was discussed. It is proved that the fluorescence quenching of BSA by NaVO_3 is a result of the formation of NaVO_3 complex in the solution. The mechanism of quenching belongs to static quenching and the association constants between NaVO_3 and BSA are $K_s=0.357 \times 10^4$ (25 °C), $K_s=0.667 \times 10^4$ (30 °C), $K_s=1.437 \times 10^4$ (35 °C). Based on the mechanism of energy transfer of dipole-dipole interaction between the donor and acceptor, we have determined the distance between 214-tryptophane residue of BSA and NaVO_3 molecule to be $R=1.069\ 5\ \text{nm}$ (25 °C), $R=1.078\ 2\ \text{nm}$ (30 °C), $R=1.080\ 6\ \text{nm}$ (35 °C).

Key words: Fluorescence spectrum; UV-Vis spectrum; BSA; NaVO_3

0 引 言

钒 (Vanadium) 是生物机体重要的微量元素之一。正常情况下, V 在生物体内含量很低, 但分布甚广。V 参与机体的多种代谢活动, 并在内环境恒定中起着重要作用。实验证明, V 的缺乏和过量都能引起生理功能异常。血清白蛋白是血浆中最丰富的蛋白

质, 可与许多内源性或外源性化合物结合^[1]。国外对 V 的生物学作用研究已有一些报道^[2,3], 而对于偏钒酸钠与牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 的相互作用却鲜见报道。从不同角度研究牛血清白蛋白与小分子偏钒酸钠的相互作用, 对于阐明药物的运输与代谢过程及了解蛋白质的结构与功能关系都是很重要的^[4-7]。

收稿日期: 2005-11-07。收修改稿日期: 2006-01-17。

国家自然科学基金(No.20261001)、高校青年教师奖及广西自然科学基金(No.0342025)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: hliang@mailbox.gxnu.edu.cn

第一作者: 边贺东, 男, 32 岁, 副教授; 研究方向: 生物无机化学、配位化学。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白 (BSA) 购自华美生物工程公司, Sigma 公司原装, 保鲜邮寄, 电泳纯(>98%), 其主要杂质为水, 脂肪酸含量少于 0.005%, 用前未经进一步纯化, 使用时用缓冲溶液配制成 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储存液于 4°C 保存, 用前稀释; 偏钒酸钠(华东师范大学化工厂, 分析纯)用缓冲溶液配制储备液, 浓度为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 其他试剂均为分析纯试剂。所有溶液保持 NaCl 浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验用水为二次去离子水。

RF-5301 型荧光分光光度计(日本, Shimadzu 公司); Cary-100 紫外-可见分光光度计(美国, Varian 公司); ZSZD 直管石英紫外线杀菌灯(国产); 460-1 型数字功率计(美国 EG&Gparc 公司); Sartorius PP-20 专业型 pH/电导/离子计(德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光光谱及同步荧光光谱测定

在 10 mL 比色管中依次加入 1.0 mL $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液及一定量的偏钒酸钠溶液, 以缓冲液 Tris-HCl 定容。在不同温度下, 以 $\lambda_{\text{ex}} = 296 \text{ nm}$ 激发 BSA, 得 $\lambda_{\text{em}} = 345 \text{ nm}$ 处的荧光光谱及 BSA 在偏钒酸钠作用下的荧光猝灭光谱; 并测定 $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 60 \text{ nm}$ 时的同步荧光光谱。

1.2.2 紫外-可见分光光谱测定

分别扫描 BSA、偏钒酸钠及 BSA 与偏钒酸钠结合后混合物的紫外可见吸收光谱。

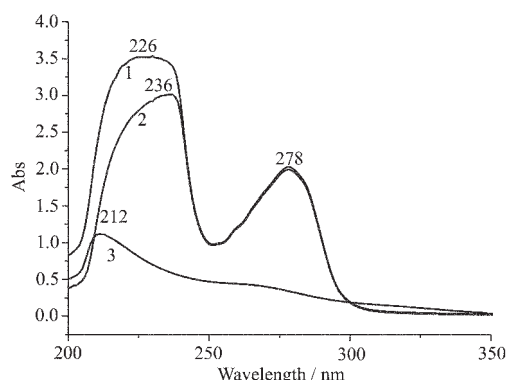
2 结果与讨论

2.1 BSA 与偏钒酸钠作用的紫外光谱

BSA 与偏钒酸钠反应前后的紫外可见光谱图(图 1) 显示, BSA 加入偏钒酸钠后, BSA 紫外吸收光谱的 226 nm 处的吸收峰红移至 236 nm 处, 吸收强度减小。血清白蛋白的 226 nm 附近的吸收峰主要是由血清白蛋白特征键肽键 $\text{C}=\text{O}$ 的 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起, 与白蛋白分子 α -螺旋有关, 而红移则表示生色基被翻转到极性较小的区域。紫外光谱的变化说明偏钒酸钠与 BSA 结合, 形成了缔合物^[8]。

2.2 BSA 与偏钒酸钠荧光猝灭机理的研究

BSA 由于其自身的色氨酸残基和酪氨酸残基而产生内源荧光。当蛋白质等荧光体在某些物质的



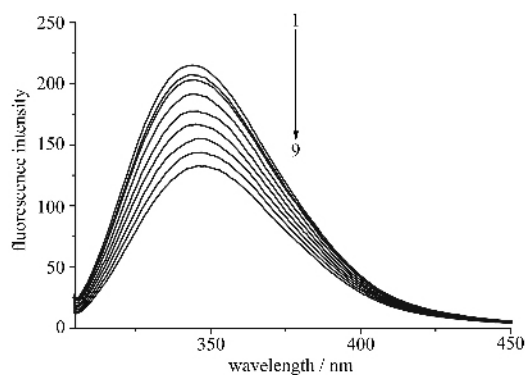
1: BSA; 2: $C_{\text{BSA}}/C_{\text{NaVO}_3} = 1/4$; 3: NaVO_3 ;

$C_{\text{NaVO}_3} = 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{BSA}} = 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 1 BSA 在加入偏钒酸钠前后紫外吸收光谱的变化图

Fig.1 A variety for adding NaVO_3 to BSA

作用下导致荧光强度降低的现象称为荧光猝灭作用, 能与荧光物质分子发生相互作用而引起荧光强度下降的物质称为猝灭剂^[9]。BSA 在 296 nm 激发, 在 345 nm 左右产生较强的荧光, 而偏钒酸钠在 $\lambda_{\text{ex}} = 296 \text{ nm}$ 时并无荧光产生。固定 BSA 的量, 加入偏钒酸钠溶液。随着偏钒酸钠浓度的增加, BSA 的荧光有规律地降低, 且峰形不发生变化(如图 2), 可见偏钒酸钠对 BSA 的荧光有猝灭作用。



$C_{\text{BSA}} = 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 25°C ; 1~9: $C_{\text{NaVO}_3} = 0 \sim 350 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 偏钒酸钠对 BSA 的荧光猝灭光谱

Fig.2 Fluorescent quenching spectra of BSA as NaVO_3 are added

荧光猝灭作用可分为动态猝灭作用和静态猝灭作用两种。对于动态猝灭作用, 可用动态猝灭结合常数 K_{SV} 来反映荧光体与猝灭剂之间相互作用的程度和猝灭作用的性质; 对于静态猝灭作用, 可以用静态结合常数 K_{LB} 来描述荧光体与猝灭剂之间相互作用的程度和猝灭作用的性质^[10]。

将过程按动态猝灭处理, 由 Stern-Volmer 公式:

$$F_0 / F = 1 + K_q \tau_0 C_Q = 1 + K_{\text{SV}} C_Q \quad (1)$$

其中 F_0 为不加猝灭剂的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, K_q 为扩散碰撞猝灭常数; τ_0 为分子荧光寿命; C_Q 为猝灭剂的浓度; K_{SV} 是 Stern-Volmer 猝灭常数。

以 F_0/F 对 C_Q 作图, 得到不同温度下的 Stern-Volmer 图(如图 3)。

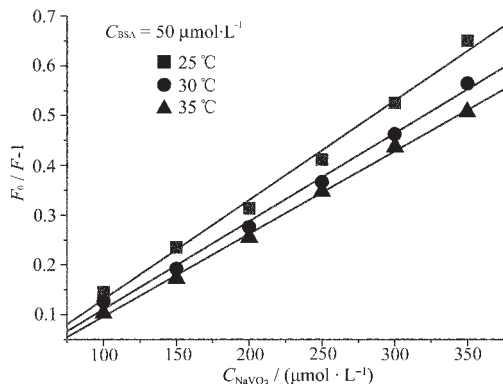


图 3 不同温度下的 Stern-Volmer 图

Fig.3 Stern-Volmer plots of NaVO_3 and BSA in different temperatures

动态猝灭依赖于扩散速率, 因而升高温度导致扩散加快, 从而猝灭常数将随着温度的升高而增大。而图 3 可见, 随着温度的升高, BSA 猝灭曲线的斜率降低, 由此可判断该过程不是动态猝灭。升高温度会导致缔合物的稳定性降低, 因此静态猝灭常数将随温度升高而减小, 可初步判断该过程为静态猝灭。若 K_{SV} 为动态猝灭常数, 由于生物大分子的荧光寿命 τ_0 约为 $10^{-8} \text{ s}^{[11]}$, 故由图 3 曲线的斜率可得猝灭速率常数 K_q , 如表 1 所示。而各类猝灭剂对生物大分子的扩散控制的 K_q 最大值为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1[11]}$, 根据表 1 可知偏钒酸钠对 BSA 荧光猝灭过程的速率常数远大于扩散控制的 K_q , 所以进一步证明以上猝灭过程为静态猝灭。

2.3 反应的结合常数与结合位点数的确定^[12]

设生物大分子 B 有 n 个相同且独立的结合位点, 则其与猝灭剂(Q, 此处为 NaVO_3)间的猝灭反应可表示为:



其结合常数 K_A 为:

$$K_A = \frac{C_{Q_nB}}{C_Q^n C_B} \quad (2)$$

C_B 是游离荧光体浓度, C_Q 是猝灭剂浓度, C_{Q_nB} 是缔合物浓度, 若荧光体总浓度为 C_{B_0} , 则 $C_{B_0} = C_{Q_nB} + C_B$,

代入(2)式得:

$$K_A = \frac{C_{B_0} - C_B}{C_Q^n C_B} \quad (3)$$

在静态猝灭过程中, 荧光体系的荧光强度 F 与游离浓度成正比(所生成的缔合物是非荧光性):

$$\frac{C_B}{C_{B_0}} = \frac{F}{F_0} \quad (4)$$

由(3)式和(4)式可得:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg C_Q \quad (5)$$

以 $-\lg \frac{F_0 - F}{F}$ 对 $-\lg C_{\text{NaVO}_3}$ 作图, 可由图中的斜率和截距求得药物与白蛋白分子的结合位点数 n 及结合常数 K_A 。结果列于表 1。

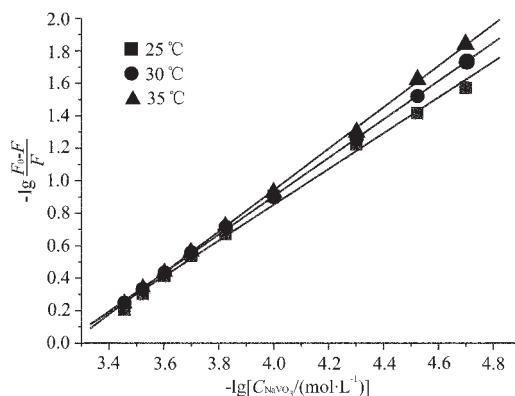


图 4 求结合点的图

Fig.4 Plots of $-\lg \frac{F_0 - F}{F}$ vs $-\lg C_{\text{NaVO}_3}$

表 1 偏钒酸钠与 BSA 在不同温度作用下的猝灭常数、结合常数与结合位点数

Table 1 Quenching parameters, the binding constants and parameters of BSA with NaVO_3 in different temperatures

$T / ^\circ\text{C}$	25 °C	30 °C	35 °C
$K_q / (10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	1.786 8	1.630 2	1.592 6
$K_A / (10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	0.357	0.667	1.437
n	1.10	1.18	1.27

2.4 偏钒酸钠与 BSA 作用距离的计算

根据 Förster 理论^[13], 无辐射能量转移的量子效率 E 可表示如下:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (6)$$

式中 R_0 为转移效率为 50% 时的临界距离, R 是给体与受体的真实距离, 其中:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} \cdot k^2 \cdot n^{-4} \cdot \Phi_D \cdot J \quad (7)$$

其中 k^2 为偶极空间取向因子, n 为介质的折射指数, Φ_D 为给予体的荧光量子产率, J 为给予体的荧光发射光谱与接受体的吸收光谱之间的光谱重叠积分。重叠积分 J 表示如下:

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^x F_D(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int_0^x F_D(\lambda) d\lambda} \quad (8)$$

式中 F_D 为荧光给体在波长 λ 的荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 为接受体在波长 λ 的摩尔消光系数。

能量转移效率 E 可由下式测定:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (9)$$

式中 F 和 F_0 分别为存在和不存在能量接受体时能量给予体的荧光发射强度。

基于 Förster 偶极-偶极无辐射能量转移, 估测了牛血清白蛋白中第一结合位置的偏钒酸钠与第 214 位色氨酸残基之间的距离。利用测定的牛血清白蛋白的荧光发射谱和偏钒酸钠的吸收光谱(图 5), 该图的重叠部分积分按公式(8), 计算出光谱重叠积分 J 。取 $\Phi=0.14$ (以色氨酸为标准), 折射指数 n 取水和有机物折射指数的平均值 1.36^[11], 取向因子取给予体和接受体各向同性的平均值 $k^2=2/3$; 将上述参数代入式(6)可得能量转移效率为 50% 时给予体和接受体之间的临界距离 $R=1.0695$ nm (25 °C), $R=1.0782$ nm (30 °C), $R=1.0806$ nm (35 °C)。

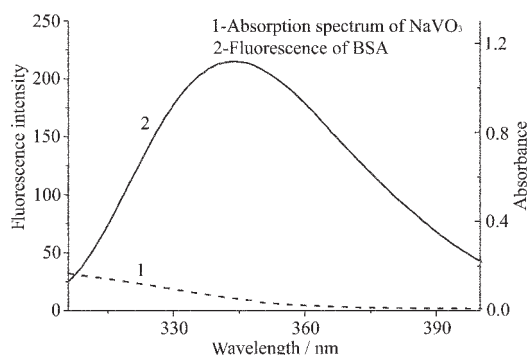


图5 偏钒酸钠的吸收光谱(1)与 BSA 的荧光光谱(2)的重叠

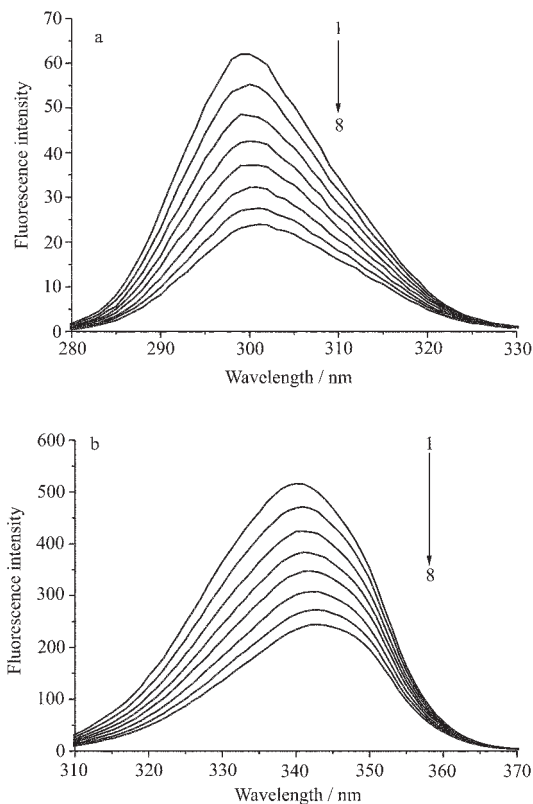
Fig.5 Overlapping plots of the fluorescence of BSA with the absorption spectrum of NaVO_3

2.5 偏钒酸钠对 BSA 构象的影响

使激发波长和发射波长保持固定的波长间距 ($\Delta\lambda$), 同步扫描激发和发射单色器, 可得到同步荧光光谱图。蛋白质的同步荧光光谱已被用来判断蛋白质

的构象变化^[11-13], 由 $\Delta\lambda=15$ nm 所得到的同步荧光光谱图仅显示蛋白质酪氨酸残基的光谱特征; 由 $\Delta\lambda=60$ nm 所得到的同步荧光光谱图仅显示蛋白质色氨酸残基的荧光光谱特征。因残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 故由发射波长的改变可判断蛋白质的构象变化。

固定蛋白质的量, 逐渐增加偏钒酸钠的浓度, 得到 BSA 的同步荧光光谱图。图 6(a)和图 6(b)分别为 BSA 中酪氨酸残基和色氨酸残基的同步荧光光谱图。随着偏钒酸钠浓度的增大, 酪氨酸残基的发射波长基本不变, 而色氨酸残基的发射波长红移, 表明偏钒酸钠与色氨酸残基发生了结合, 使得色氨酸所处环境的疏水性降低, BSA 内部的疏水结构有所瓦解, 肽链的伸展程度增加^[14,15]。



(a) The synchronous fluorescence spectra of tyrosine remnant;
(b) The synchronous fluorescence spectra of tryptophan remnant;
1~8: $C_{\text{NaVO}_3} = 0 \sim 120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图6 BSA 的同步荧光光谱图

Fig.6 Synchronous fluorescence spectra of BSA

2.6 紫外光(253.7 nm)照射对偏钒酸钠与 BSA 结合的影响

本文就紫外光 (253.7 nm) 照射对偏钒酸钠与

BSA 结合的影响作了两组对照实验。第一组,首先用 253.7 nm 的紫外光照射 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA,然后加入偏钒酸钠与之作用,按式(1)和(5)处理其作用结果如图 7a,8a 所示;第二组,首先使偏钒酸钠与 BSA 混合,而后混合物受紫外照射同样的时间,以同样的方式处理其作用结果如图 7b,8b 所示。偏钒酸钠与 BSA 的作用的荧光猝灭常数、结合常数及结合位点数如表 2 所示。照射过的 BSA 加偏钒酸钠的结合随着 BSA 照射时间的延长,偏钒酸钠对 BSA 的荧光猝灭常数逐渐降低,偏钒酸钠与 BSA 的结合常数及结合位点数却逐渐升高;偏钒酸钠与 BSA 的混合物受紫外照射,随着照射时间的延长,偏钒酸钠对 BSA 的荧光猝灭常数也逐渐降低,而偏钒酸钠与 BSA 的结合常数及结合位点数也逐渐减小,以上结果显示紫外照射的 BSA 更有利于其与 NaVO_3 结合,相反的 BSA 与 NaVO_3 结合后,紫外照射会破坏其结合。

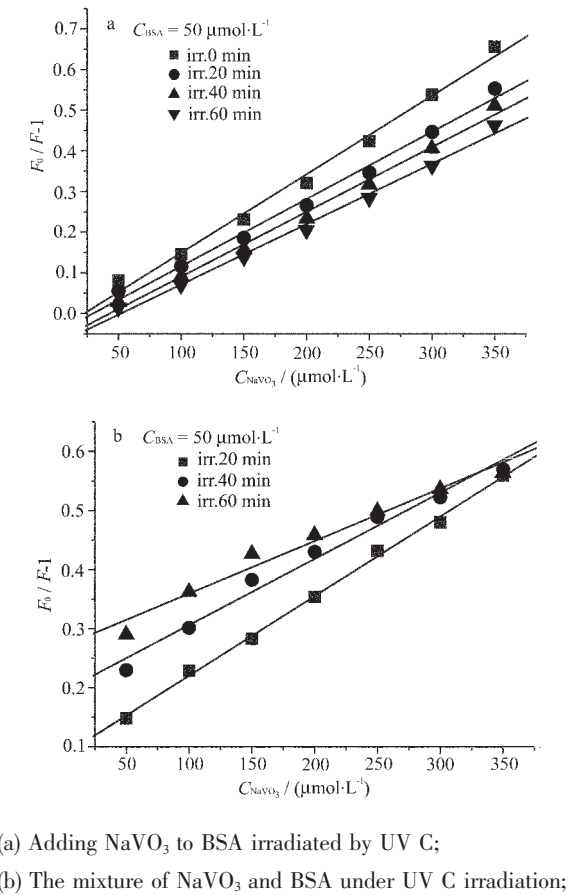
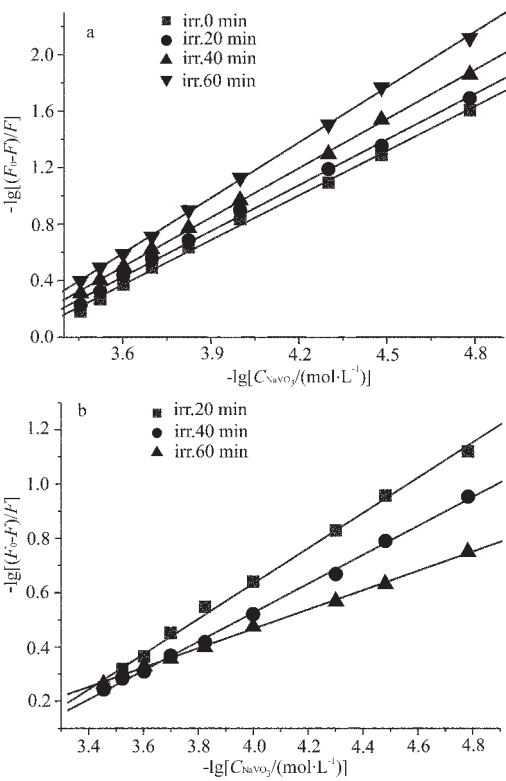


图 7 紫外光(253.7nm)照射下 BSA 与 NaVO_3 结合的 Stern-Volmer 图

Fig.7 Stern-Volmer plots of NaVO_3 and BSA under different time of UV C(253.7nm) irradiation



(a) Adding NaVO_3 to BSA irradiated by UV C;
(b) Mixture of NaVO_3 and BSA under UV C irradiation

图 8 $-\lg \frac{F_0-F}{F}$ vs $-\lg C_{\text{NaVO}_3}$ 图
Fig.8 Plots of $-\lg \frac{F_0-F}{F}$ vs $-\lg C_{\text{NaVO}_3}$

表 2 偏钒酸钠与 BSA 作用的猝灭常数、结合常数及结合点

Table 2 Quenching parameters, the binding constants and parameters of BSA with NaVO_3

Irr time / min	0	20	40	60
$K_q / (10^{11}\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	1.786 8	1.653 2	1.593 0	1.484 6
$K'_q / (10^{11}\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	1.786 8	1.346 2	1.119 6	0.889 0
$K_D / (10^4\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	0.264 0	0.288 0	0.485 0	1.290 0
$K'_D / (10^4\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	0.264 0	0.009 3	0.004 0	0.000 9
n	1.05	1.08	1.16	1.31
n'	1.05	0.65	0.53	0.36

K_q , K_D and n are the interaction of adding NaVO_3 to BSA irradiated by UV C; K'_q , K'_D and n' are the interaction of the mixture of NaVO_3 and BSA under UV C irradiation

3 结 论

本文用荧光猝灭光谱和紫外吸收光谱研究了酸根离子化合物偏钒酸钠与牛血清白蛋白的作用,发现偏钒酸钠对 BSA 的作用为静态猝灭。并用非辐射

能量转移理论研究了偏钒酸钠与 BSA 的色氨酸残基 214 之间的距离 $R=1.069\ 5\ \text{nm}(25\ ^\circ\text{C})$, $R=1.078\ 2\ \text{nm}(30\ ^\circ\text{C})$, $R=1.080\ 6\ \text{nm}(35\ ^\circ\text{C})$ 。而且研究紫外照射对偏钒酸钠与 BSA 结合的影响时,发现紫外照射对偏钒酸钠与 BSA 猝灭常数、结合常数及结合点有一定的影响。这些实验结果对讨论微量元素的代谢机制提供了可靠的实验证据。同时对进一步了解白蛋白的结构和功能关系也提供了可靠的实验结果。

参考文献:

- [1] Bhattacharya A A, Curry S, Franks N P. *J. Biol. Chem.*, **2000**,**275**:38731~38738
- [2] Nakashima H, KaKei M, Tanaka H. *Rur-J-Pharmacol.*, **1993**, **233**(3):219~226
- [3] Farrukh T S, Michael J R. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **1992**,**145**(6):1389~1397
- [4] Tanaka M, Asahi Y, Masuda S, et al. *Chem. Pharm. Bull.*, **1998**,**46**(5):817
- [5] Robert E B, Steven L B. *Chem. Rev.*, **1997**,**97**:1359
- [6] CHI Yan-Hua(迟燕华), ZHUANG Jia(庄稼), DONG Fa-Qin(董发勤), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chimica Sinica)*, **2000**,**58**(1):82
- [7] Mauricio S B, Guilherme L I. *J. Phys. Chem. B*, **1998**,**102**:4678
- [8] Shahid F, Gomez J E. *J. Biol. Chem.*, **1982**,**257**(10):5618~5622
- [9] CHEN Guo-Zhen(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), XU Jin-Jun(许金钧), et al. *The Methods of Fluorescence Spectrum*(荧光分析法). Beijing:Science Press, **1990**.112~114
- [10] YAN Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *The Principle of Bioinorganic Chemistry*(生物无机化学原理). Beijing: Science Press, **2002**.329~332
- [11] YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Pin(杨频), ZHANG Li-Wei(张立伟). *Kexue Tongbao(Chinese Science Bulletin)*, **1994**,**9**(1):31~35
- [12] ZHANG Hai-Rong(张海容), GUO Si-Yuan(郭祀远), LI Lin(李林), et al. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi(Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **2001**,**21**(6):829~831
- [13] HUANG Bo(黄波), ZOU Guo-Lin(邹国林), YANG Tian-Ming(杨天鸣). *Huaxue Xuebao(Acta Chimica Sinica)*, **2002**, **60**(10):1867~1871
- [14] Anderson N G. *Clin. Chem.*, **1982**,**28**:739~748
- [15] Crans D C. *Comments Inorg. Chem.*, **1994**,**16**(1~2):1~33