

## 稀土金属离子与人血清白蛋白的相互作用

宋玉民\* 吴锦绣 郑秀荣 吴琼  
(西北师范大学化学化工学院, 兰州 730070)

**摘要:** 本文用荧光光谱、紫外-可见吸收光谱法和循环伏安法研究了稀土金属离子  $\text{Eu(III)}$ 、 $\text{Pr(III)}$  与人血清白蛋白(HSA)的相互作用。实验发现; $\text{Eu(III)}$ 和  $\text{Pr(III)}$ 对 HSA 有较强的荧光猝灭作用。用 Stern-Volmer 方程分别对实验数据进行处理,结果发现:HSA 与  $\text{Eu(III)}$ 、 $\text{Pr(III)}$ 发生反应生成了新的复合物,发生了分子内的非辐射能量转移。 $\text{Eu(III)}$ 、 $\text{Pr(III)}$ 对 HSA 的荧光猝灭作用,属于静态荧光猝灭。荧光猝灭图表明; $\text{Eu}^{3+}$ 和  $\text{Pr}^{3+}$ 在 HSA 分子中至少有两类结合位点, $\text{Eu}^{3+}$ 与 HSA 形成 2.76:1 的复合物,结合常数  $\lg K$  分别为 12.03 和 9.05; $\text{Pr}^{3+}$ 与 HSA 形成 2.2:1 的复合物,结合常数  $\lg K$  分别为 9.89 和 6.97。同时用圆二色谱及同步荧光光谱法探讨了  $\text{Eu(III)}$ 和  $\text{Pr(III)}$ 对 HSA 构象的影响。

**关键词:** 稀土离子; 人血清白蛋白; 吸收光谱; 荧光光谱; 圆二色谱; 电化学

中图分类号: O614.33\*4; O614.33\*8 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2006)09-1615-08

## Interaction of Rare Earth Ions with Human Serum Albumin

SONG Yu-Min\* WU Jin-Xiu ZHENG Xiu-Rong WU Qiong  
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070)

**Abstract:** The interaction of  $\text{Eu(III)}$  and  $\text{Pr(III)}$  with HSA was studied by fluorescence spectrum and ultra-violet spectrum and electrochemistry. It was shown that these ions have a quite strong ability to quench the fluorescence launching of HSA. After analyzing the fluorescence quenching data according to Stern-Volmer equation, It was found that HSA reacted with  $\text{Eu(III)}$  and  $\text{Pr(III)}$  to form a new complex-system. The quenching belonged to static fluorescence quenching, with non-radiation energy transfer happening within single molecule. The composition of the  $\text{Eu-HSA}$  complex is  $\text{Eu}_{2.76}:\text{HSA}$  and the binding constants:  $\lg K=12.03$ ,  $\lg K=9.05$ ; The composition of the  $\text{Pr-HSA}$  complex is  $\text{Pr}_{2.2}:\text{HSA}$  and the binding constants:  $\lg K=9.89$ ,  $\lg K=6.97$  at room temperature. The effect of  $\text{Eu(III)}$  and  $\text{Pr(III)}$  on the conformation of HSA was analyzed by circular dichroism (CD) and synchronous fluorescence spectra.

**Key words:** rare earth ions; human serum albumin; absorption spectra; fluorescence spectra; circular dichroism spectra; electrochemistry

## 0 引言

随着稀土在农业及医学应用领域的不断扩展,稀土离子与生物大分子的配位作用以及对生物大分子结构的影响也日益受到重视。蛋白质是一种含多

个配位基团的生物大分子,其生物功能与其特定结构密切相关<sup>[1,2]</sup>。稀土离子进入人体内与蛋白质发生作用,有可能影响甚至改变蛋白质分子固有的结构和功能,因此研究稀土与蛋白质的相互作用对于了解稀土离子在体内的代谢过程及生物效应的作用机

收稿日期:2006-03-20。收修改稿日期:2006-05-30。

甘肃省自然科学基金(No.3ZS051-A25-021)和甘肃省高分子材料重点实验室资助项目。

\*通讯联系人。E-mail: songym@nwnu.edu.cn

第一作者:宋玉民,女,55岁,教授;研究方向:生物无机化学。

理有实际而深远的意义<sup>[1,2]</sup>。

现在人们比较关注稀土离子与生物体内酶和蛋白等重要生物大分子的相互作用。如稀土离子可作为巯基蛋白酶的抑制剂和血兰蛋白在脂质双层中形成离子通道,稀土离子通过与卵磷脂的结合以及中和负电荷而促进新通道的形成已有报道<sup>[3]</sup>。而蛋白质与酶不同,血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白,它和许多内源性和外源性物质广泛结合<sup>[4]</sup>。因此进行小分子和血清白蛋白相互作用的研究具有重要意义,可以从分子水平认识蛋白质与小分子相互作用的机理,从而为生命科学及药物研究提供有用的信息。目前主要用 pH 电位法<sup>[5]</sup>、平衡透析法<sup>[6]</sup>、离心超过滤法<sup>[7]</sup>等研究稀土离子与牛血清白蛋白的相互作用,而光谱法特别是循环伏安法在该领域的研究较少。

本文主要用光谱法和循环伏安法研究稀土离子 Eu(III)和 Pr(III)与人血清白蛋白(HSA)的相互作用,考察了稀土离子对 HSA 构象的影响,为今后进一步开发、利用稀土资源及从事稀土生物无机化学、药物化学等领域的研究提供了一些具有理论和应用价值的信息。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

人血清白蛋白(HSA)为华兰生物工程股份有限公司产品;Pr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和 Eu<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(纯度≥99.99%,甘肃稀土公司),用浓盐酸数滴小心加热溶解,待水分蒸发近干,配制 0.01 mol·L<sup>-1</sup> RECl<sub>3</sub> 储备液,实验时根据需要稀释;配制 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲溶液, pH=6.38, (内含 0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 的溶液,维持离子强度)和 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HAc-NaAc 缓冲溶液, pH=5.79, (内含 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 的溶液,支持电解质);实验用水为去离子二次蒸馏水;其余试剂均为分析纯试剂。

Agilent-8453 紫外分光光度计(美国 Agilent 公司);LS-55 荧光分光光度计(美国 PE 公司);J-810 圆二色谱仪(日本 Jasco 公司);CHI 832 电化学工作站(美国 CHI 公司),采用三电极系统:裸玻碳电极作为工作电极,铂丝电极作为对电极,Ag/AgCl 电极作为参比电极(美国 CHI 公司),裸玻碳电极的面积是 2.36 × 10<sup>-2</sup> cm<sup>2</sup>;Branson200 超声清洗仪(美国)用来清洗电极;pHS-25 型酸度计(上海第二分析仪器厂);RF-540 荧光分光光度计(日本岛津公司);TB-85 型恒温器(日本岛津公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 紫外吸收光谱(UV)的测定

RECl<sub>3</sub> 溶液和 HSA 溶液均用 pH=6.38 的缓冲溶液稀释。20 ℃下,向加有 2.5 mL 1.0 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> HSA 溶液的 1 cm 石英吸收池中每次滴加不同体积的相应稀土离子(0.01 mol·L<sup>-1</sup>)溶液,以 4.0 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>的相应稀土离子溶液为参比,逐次扫描紫外吸收光谱。

#### 1.2.2 荧光光谱(FS)的测定

20 ℃下,在一系列 10 mL 的比色管中,分别加入 0.5 mL 的 1.0 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的 HSA 溶液,然后依次加入 0.5、1.5、3.5、7.5、15.5、35.5、85.5 μL 的稀土离子(0.01 mol·L<sup>-1</sup>)溶液,以 pH=6.38 缓冲溶液定容至 5 mL,摇匀后测定荧光光谱、同步荧光光谱。样品池为 1 cm 石英吸收池。

#### 1.2.3 圆二色谱(CD)的测定

20 ℃下,在一系列 10 mL 的比色管中,分别加入一定体积的 HSA 溶液,然后依次加入不同体积的稀土离子溶液,摇匀后分别测定圆二色谱。以相应的空白溶液为参比。样品池为 1 cm 石英吸收池。

#### 1.2.4 电化学的测定

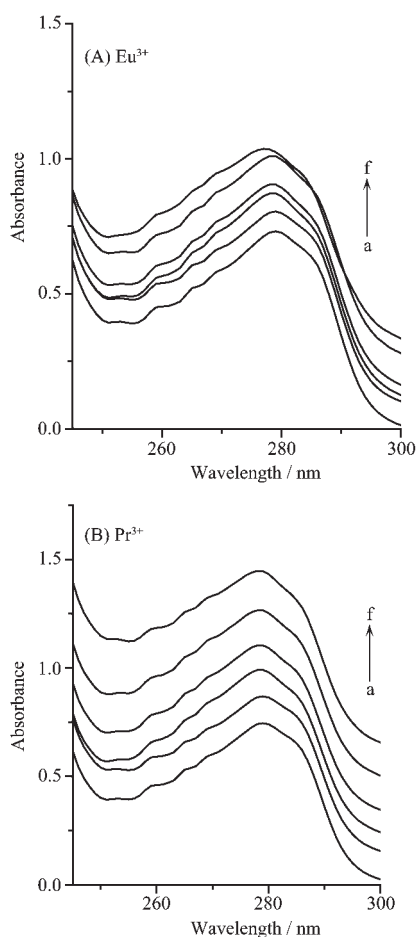
20 ℃下,将含有 Eu<sup>3+</sup>的 pH=5.79 的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HAc-NaAc 缓冲溶液 10 mL 加入电解池中通氮气 15 min,然后进行循环伏安扫描,扫描速度为 50 mV·s<sup>-1</sup>。在扫描过程中固定 Eu<sup>3+</sup>浓度不变,改变 HSA 的浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫外吸收光谱的测定

Eu<sup>3+</sup>和 Pr<sup>3+</sup>在波长 260~300 nm 范围内无吸收。从图 1 可知,随着稀土离子 Eu<sup>3+</sup>和 Pr<sup>3+</sup>的加入,HSA 在 279 nm 处吸收强度逐渐增强,峰位缓慢紫移。当加入 Eu<sup>3+</sup>后 HSA 在 279 nm 处吸收峰位紫移到 277 nm,而加入 Pr<sup>3+</sup>后 HSA 在 279 nm 处吸收峰位紫移到 278 nm。

HSA 在 279 nm 处的吸收峰是其肽链上的色氨酸和酪氨酸的苯杂环  $\pi-\pi^*$  跃迁引起的,吸收强度随稀土离子浓度的增加而增强,说明稀土离子配位诱导 HSA 分子发生类似降 pH 值所出现的蛋白质肽链伸展现象<sup>[8]</sup>,使包围在 HSA 分子内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳杂环疏水基团裸露出来,使吸收强度增强,同时疏水基团之间的疏水作用减弱, $\pi-\pi^*$  跃迁能量增大,使吸收峰发生紫移。



$c_{\text{HSA}} = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

(A) Eu-HSA system: from a to f curves  $c_{\text{Eu}^{3+}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ :

0, 10, 15, 21, 27, 35, respectively

(B) Pr-HSA system: from a to f curves  $c_{\text{Pr}^{3+}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ :

0, 10, 16, 24, 34, 50, respectively

图1  $\text{Eu}^{3+}$ 和 $\text{Pr}^{3+}$ 对HSA的紫外吸收光谱的影响

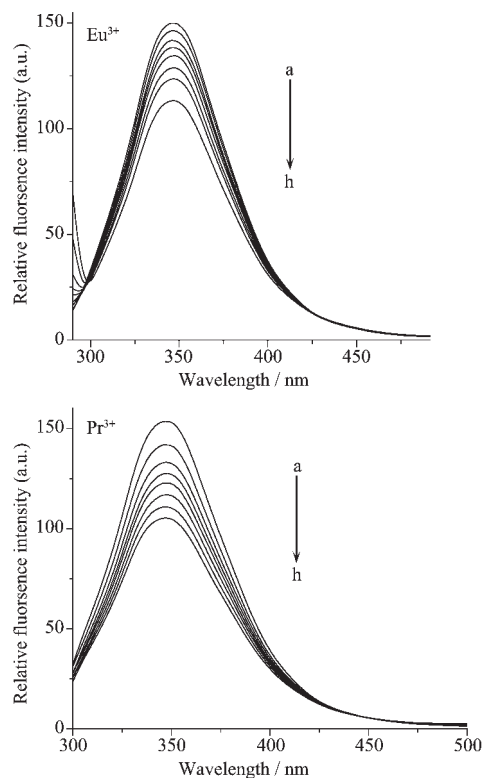
Fig.1 Effect of  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Pr}^{3+}$  on the absorption spectra of HSA

## 2.2 荧光光谱

### 2.2.1 荧光猝灭光谱和猝灭机理

蛋白质能够发出荧光,是因为蛋白质中存在三种芳香族氨基酸——色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。由于这些氨基酸具有不同的结构,通常荧光强度比为100:9:0.5<sup>[9]</sup>,因此在大多数情况下,可以认为蛋白质所显示的荧光主要来自色氨酸残基的贡献,而且含色氨酸残基的蛋白质的天然荧光及其变化直接反映了蛋白质中色氨酸残基本身及其周围环境的变化。HSA在激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 时,最大发射波长 $\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$ ,在同一条件下,分别测定向HSA溶液中滴加不同稀土离子溶液前后的荧光光谱。如图2所示。

在 $37^\circ\text{C}$ 时的HSA荧光猝灭光谱与 $20^\circ\text{C}$ 时的相似,最大荧光发射峰的位置未变,依据文献报道<sup>[10]</sup>,HSA的构象不随温度的变化而变化,所以在所测温度下不需要考虑HSA构象的变化。



$20^\circ\text{C}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{HSA}} = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

from a to h curves  $c_{\text{RE}^{3+}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ : 0, 01, 03, 07, 15, 31,

71, 171, respectively

图2  $\text{Eu}^{3+}$ 和 $\text{Pr}^{3+}$ 离子对HSA溶液荧光光谱的影响

Fig.2 Emission spectra of HSA in the presence and absence of  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Pr}^{3+}$

从图2中可看出, $\text{RE}^{3+}$ 的加入并未改变HSA的最大荧光发射峰的位置,但荧光强度却随着 $\text{RE}^{3+}$ 的加入量的增加而逐渐减弱。由于HSA溶液的体积(5 mL)远远大于所滴加的稀土离子溶液的体积( $\leq 100 \mu\text{L}$ ),所以可忽略稀释效应。在严格控制pH值、温度的条件下,能使HSA荧光发生猝灭的原因有下述3种可能:动态猝灭、静态的形成缔合物的猝灭以及非辐射能量转移的影响<sup>[11]</sup>。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用过程,其作用遵循Stern-Volmer方程:

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

其中 $F_0$ 为未加猝灭剂时的荧光强度; $F$ 为加入猝灭剂后的荧光强度; $K_q$ 为双分子猝灭过程的速率

常数;  $\tau_0$  为没有猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命;  $K_{SV}$  称为 Stern-Volmer 猝灭常数, 是双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率,  $c_Q$  为猝灭剂的浓度。

静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子在基态时生成不发光的缔合物, 从而导致荧光物质荧光强度降低的过程。

若  $K_{SV}$  为动态猝灭常数, 由于生物大分子的荧

光寿命<sup>[12]</sup> $\tau_0$  约为  $10^{-8}$  s, 而在没有猝灭剂存在时, HSA 的荧光寿命  $\tau_0=1.77 \times 10^{-9}$  s<sup>[13]</sup>, 故由式(1)可求得猝灭速率常数见表 1, 而各类猝灭剂对生物大分子的  $K_q$  最大值<sup>[12]</sup>为  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。由表 1 可知  $\text{RE}^{3+}$  对 HSA 荧光的猝灭过程速率常数远远都大于最大扩散控制的速率常数, 可以初步判断  $\text{RE}^{3+}$  对 HSA 的荧光猝灭可能是属于生成复合物的静态猝灭。

表 1 不同温度下稀土离子与 HSA 结合的 Stern-Volmer 常数与相应的直线关系

Table 1 Stern-Volmer quenching constant and the linear relation of  $K_q$  and  $T$  at different temperatures

|                  | $T / \text{K}$ |                                                 | $K_q / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ | $R$     |
|------------------|----------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------|
| $\text{Eu}^{3+}$ | 293            | $n_{\text{Eu}^{3+}} / n_{\text{HSA}} \leq 2.76$ | $2.99 \times 10^{12}$                                        | 0.992 2 |
|                  |                | $n_{\text{Eu}^{3+}} / n_{\text{HSA}} > 2.76$    | $6.16 \times 10^{11}$                                        | 0.999 3 |
|                  | 310            | $n_{\text{Eu}^{3+}} / n_{\text{HSA}} \leq 2.76$ | $2.88 \times 10^{12}$                                        | 0.990 1 |
|                  |                | $n_{\text{Eu}^{3+}} / n_{\text{HSA}} > 2.76$    | $4.38 \times 10^{11}$                                        | 0.993 2 |
| $\text{Pr}^{3+}$ | 293            | $n_{\text{Pr}^{3+}} / n_{\text{HSA}} \leq 2.2$  | $2.18 \times 10^{12}$                                        | 0.990 6 |
|                  |                | $n_{\text{Pr}^{3+}} / n_{\text{HSA}} > 2.2$     | $5.99 \times 10^{11}$                                        | 0.996 3 |
|                  | 310            | $n_{\text{Pr}^{3+}} / n_{\text{HSA}} \leq 2.2$  | $1.84 \times 10^{12}$                                        | 0.989 9 |
|                  |                | $n_{\text{Pr}^{3+}} / n_{\text{HSA}} > 2.2$     | $4.40 \times 10^{11}$                                        | 0.999 5 |

动态与静态猝灭也可依据不同温度下的猝灭常数得以区别。对动态猝灭, 随着温度的升高, 将增加离子有效碰撞数目, 加剧电子的转移, 使荧光物种的猝灭常数随温度的升高而增大; 若是静态猝灭, 则温度升高将降低缔合物的稳定性, 使猝灭常数减小。由图 3 和表 1 可知, 随着温度的升高, 稀土离子对 HSA 的猝灭曲线斜率均降低, 即速率常数随温度的升高而减小, 这进一步表明稀土离子对 HSA 的荧光猝灭作用不是由扩散和碰撞引起的动态猝灭, 而是生成复合物的静态猝灭。

荧光能量转移可分为辐射能量转移和非辐射能

量转移。若发生辐射能量转移, 会导致物质的荧光光谱畸变。图 2 中 HSA 的荧光光谱都没有畸变, 因此 HSA 与  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Pr}^{3+}$  之间的能量转移不应为辐射能量转移。同时  $\text{Eu}^{3+}$  的荧光被敏化(见图 4), 在 585 nm 左右出现一个荧光发射峰。相应的荧光强度随与  $\text{Eu}^{3+}$  结合的 HSA 的量增加而增加, 这说明 HSA 分子与  $\text{Eu}^{3+}$  之间存在能量转移, 即 HSA 与  $\text{Eu}^{3+}$  有配位作用。非辐射能量转移包括分子内能量转移和分子间能量转移。若供能体与受能体结合生成了复合物, 则两者之间的能量转移为分子内能量转移, 否则为分子间能量转移。由上述分析可知, HSA 与  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Pr}^{3+}$  之间

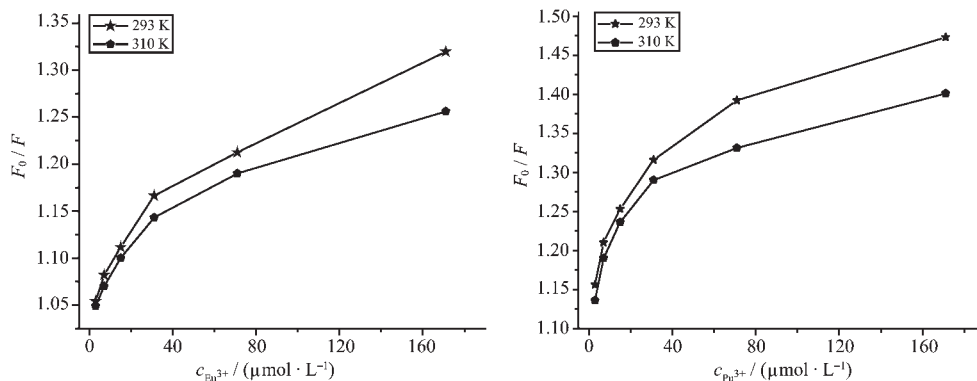
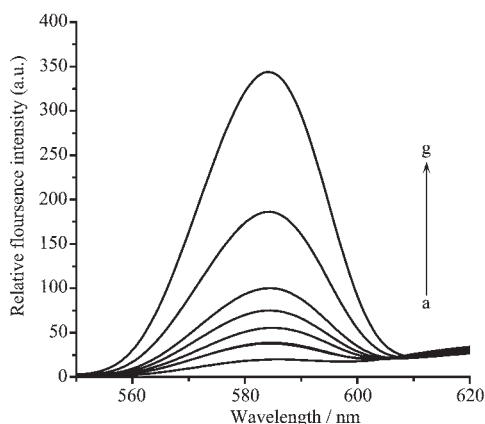


图 3 稀土离子对 HSA 的 Stern-Volmer 曲线

Fig.3 Stern-Volmer curves of rare earths on HSA

的能量转移应属于分子内的非辐射能量转移。



$c_{\text{Eu}^{3+}} = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

from a to g curves  $c_{\text{HSA}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ : 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, respectively

图4 HSA 溶液对  $\text{Eu}^{3+}$  离子荧光光谱的影响

Fig.4 Emission spectra of  $\text{Eu}^{3+}$  in the presence and absence of HSA

## 2.2.2 稀土离子与 HSA 的结合常数及其结合比的测定

以  $\text{RE}^{3+}$  滴定 HSA 时的相对荧光强度  $F_0/F$  ( $F_0$  为 HSA 溶液在 348 nm 的荧光强度,  $F$  为加入  $\text{RE}^{3+}$  后 HSA 在 348 nm 荧光强度) 对  $\text{RE}^{3+}$  与 HSA 的物质的量比作图(图 5), 曲线在  $n_{\text{Eu}^{3+}}:n_{\text{HSA}}=2.76:1$ ,  $n_{\text{Pr}^{3+}}:n_{\text{HSA}}=2.2:1$  处出现明显的转折, 说明  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Pr}^{3+}$  在 HSA 分子中至少有两类结合位点<sup>[14,15]</sup>, 形成了  $\text{Eu}_{2.76} \cdot \text{HSA}$  和  $\text{Pr}_{2.2} \cdot \text{HSA}$  配合物。根据文献<sup>[14,15]</sup>, 稀土离子与 HSA 的结合常数求算如下:



$$\frac{c_{\text{HSA}_{\text{total}}} - c_{\text{Pr}_{2.2} \cdot \text{HSA}}}{c_{\text{HSA}_{\text{total}}}} = \frac{F}{F_0} \quad (3)$$

$$c_{\text{Pr}^{3+}} = c_{\text{Pr}_{\text{total}}} - 2.2c_{\text{Pr}_{2.2} \cdot \text{HSA}} \quad (4)$$

式(2)的结合常数为:

$$K = \frac{c_{\text{Pr}_{2.2} \cdot \text{HSA}}}{c_{\text{HSA}_{\text{total}}} - c_{\text{Pr}^{3+}}} = \frac{1 - F \times F_0^{-1}}{(c_{\text{Pr}^{3+}} - 2.2c_{\text{HSA}_{\text{total}}} + 2.2F \times F_0^{-1} c_{\text{HSA}_{\text{total}}})^{2.2} \times F \times F_0^{-1}}$$

在室温 (20 °C)、pH=6.38 和离子强度为  $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 条件下,  $\text{RE}^{3+}$  与 HSA 结合的结合常数为: 当  $n_{\text{Eu}^{3+}}/n_{\text{HSA}} \leq 2.76$ ,  $K_{\text{Eu}^{3+}} = 1.07 \times 10^{12}$ , 即  $\lg K = 12.03$ , 当  $n_{\text{Eu}^{3+}}/n_{\text{HSA}} > 2.76$ ,  $K_{\text{Eu}^{3+}} = 1.11 \times 10^9$ , 即  $\lg K = 9.05$ ; 当  $n_{\text{Pr}^{3+}}/n_{\text{HSA}} \leq 2.2$ ,  $K_{\text{Pr}^{3+}} = 7.79 \times 10^9$ , 即  $\lg K = 9.89$ ,

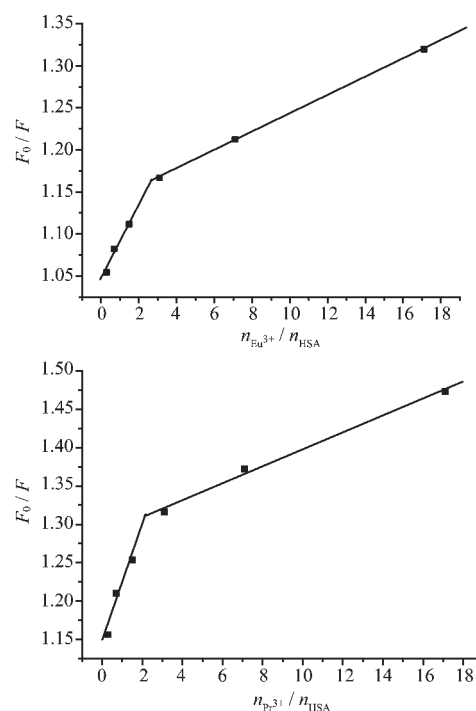


图5 稀土离子对 HSA 的荧光猝灭效应

Fig.5 Quenching effect of rare earths on HSA fluorescence

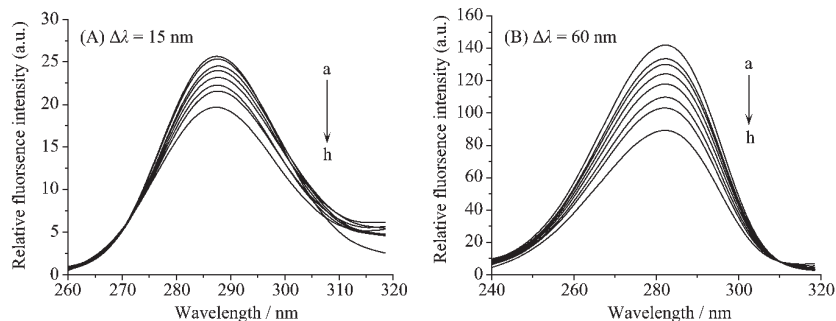
当  $n_{\text{Pr}^{3+}}/n_{\text{HSA}} > 2.2$  时,  $K_{\text{Pr}^{3+}} = 9.32 \times 10^6$ , 即  $\lg K = 6.97$ 。从以上数据可看出,  $\text{Eu}^{3+}$  结合 HSA 的能力大于  $\text{Pr}^{3+}$ , 这说明在人体内对血清白蛋白的储存和转运  $\text{Eu}^{3+}$  比  $\text{Pr}^{3+}$  的能力强。

## 2.3 HSA 的构象变化

### 2.3.1 同步荧光光谱

固定激发波长和发射波长的间距  $\Delta\lambda$ , 同步扫描激发和发射单色器可得同步荧光光谱, 这种光谱已被用于蛋白质构象变化的分析<sup>[16]</sup>。对于蛋白质的同步荧光光谱,  $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$  时只表现出酪氨酸残基的荧光,  $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$  时仅表现出色氨酸残基的荧光<sup>[16]</sup>。因为氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的疏水性有关, 所以由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。

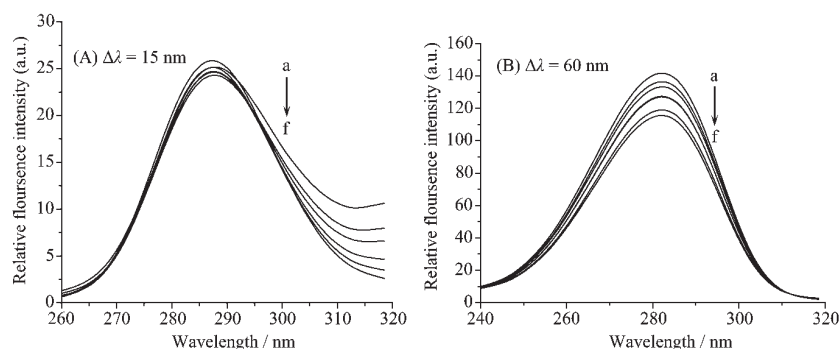
HSA 的空间结构由 3 个结构域组成, 每个结构域由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 几乎所有疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部, 构成疏水腔<sup>[17]</sup>。在室温 (20 °C), 固定 HSA 浓度, 逐渐增大  $\text{RE}^{3+}$  的浓度, 记录  $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$  时的同步荧光光谱(图 6、7)。发现在 HSA 的同步荧光光谱中, 酪氨酸残基的最大发射波长的峰位置基本没变, 而色氨酸残基的最大发射波长峰位置都略红



$c_{\text{HSA}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; from a to h curves  $c_{\text{Eu}^{3+}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ : 0, 0.4, 0.8, 1.8, 7.8, 13.8, 33.8, 83.8, respectively

图 6  $\text{Eu}^{3+}$ 对 HSA 的同步荧光光谱的影响

Fig.6 Effect of  $\text{Eu}^{3+}$  on the synchronous fluorescence spectrum of HSA



$c_{\text{HSA}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; from a to f curves  $c_{\text{Pr}^{3+}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ : 0, 0.4, 1.6, 4.6, 10.6, 20.6, respectively

图 7  $\text{Pr}^{3+}$ 对 HSA 的同步荧光光谱的影响

Fig.7 Effect of  $\text{Pr}^{3+}$  on the synchronous fluorescence spectrum of HSA

移且强度逐渐降低。表明稀土离子的加入使 HSA 的构象都发生变化,色氨酸残基所处环境的疏水性降低, $\text{RE}^{3+}$ 离子的结合部位可能都处于这种疏水腔中,使 HSA 内部的疏水结构有所瓦解,肽链的伸展程度增加<sup>[18]</sup>。这与吸收光谱分析结果相一致。

### 2.3.2 圆二色谱(CD)

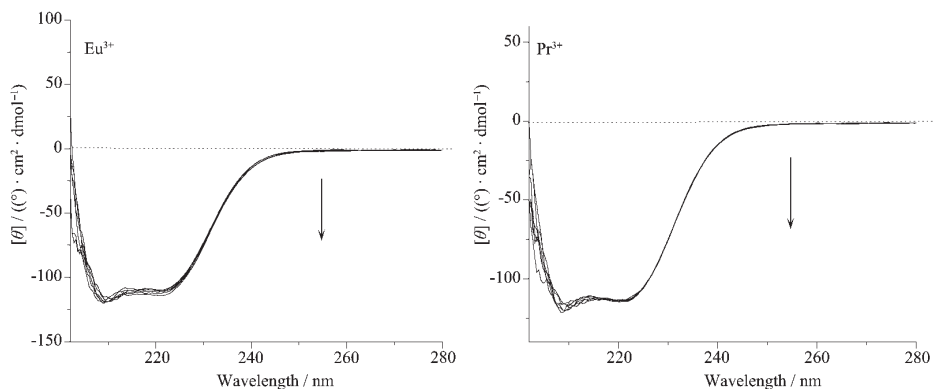
HSA 是光学活性物质,因此可测量它的 CD 谱,从而了解其构象(结构)。当加入其他物质后,可观察

其 CD 谱的变化进而了解其结构的变化。一般 CD 谱用椭圆值 $[\theta]$ <sup>[19]</sup>表示,若使用单位浓度与单位光程长度,则 $[\theta]$ 可表示为:

$$[\theta]=3300(A_L - A_R) \quad (5)$$

单位为“(°)·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>”, $A_L$ 和 $A_R$ 分别为物质对入射的左旋和右旋偏振光的吸收率。

由图 8 看出,随着  $\text{RE}^{3+}$ 浓度的增加,HSA 分子典型二级结构在 208 nm 和 222 nm 处的负峰变化



$c_{\text{HSA}}=0.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; from a to g curves  $c_{\text{RE}^{3+}} / (\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$ : 0, 0.40, 0.80, 0.12, 0.16, 0.20, 0.24, respectively

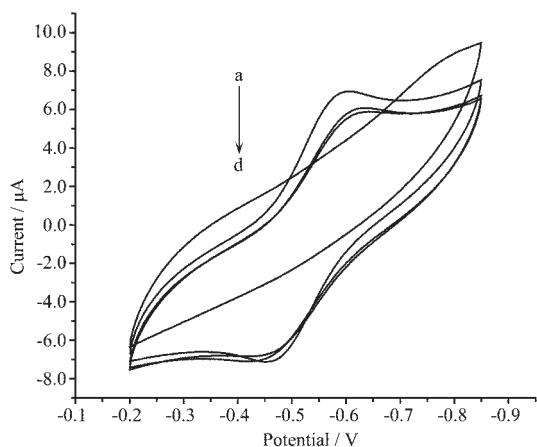
图 8  $\text{RE}^{3+}$ 对 HSA 溶液的 CD 光谱的影响

Fig.8 Effect of  $\text{RE}^{3+}$  on the CD spectra of HSA solution

不大。说明在此条件下  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Pr}^{3+}$  对 HSA 的二级结构有所影响,但影响不大。

## 2.4 循环伏安法研究 HSA 与 $\text{Eu}^{3+}$ 的相互作用

图 9 所示,在裸玻碳电极上  $\text{Eu}^{3+}$  有一对准可逆的氧化还原峰,分别在  $-0.590\text{ V}$  和  $-0.478\text{ V}$ 。其峰电位差  $\Delta E(E_{\text{pa}} - E_{\text{pc}})$  为  $112\text{ mV}$ 。随着 HSA 浓度的增大,  $\text{Eu}^{3+}$  的氧化还原峰电流显著降低,同时峰电位分别移至  $-0.609\text{ V}$  和  $-0.455\text{ V}$ 。峰电位差值增大至  $154\text{ mV}$ ,说明该氧化还原过程的可逆性降低。峰电流的减小,说明体系中游离  $\text{Eu}^{3+}$  浓度在不断下降,表明  $\text{Eu}^{3+}$  与 HSA 发生作用形成了复合物<sup>[20]</sup>。当  $c_{\text{HSA}} = 1.8 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,这对氧化还原峰基本消失,表明在玻碳电极上  $\text{Eu}^{3+}$  和 HSA 之间发生了强烈作用,生成比较稳定的复合物<sup>[21]</sup>,这与通过荧光光谱分析所得的该复合物具有较大的结合常数结果相吻合。



$c_{\text{HSA}} = 1.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

a.  $0.50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Eu}^{3+}$  (10 mL);

b. a +  $6.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ HSA}$  (40  $\mu\text{L}$ );

c. b +  $6.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ HSA}$  (40  $\mu\text{L}$ );

d. c +  $6.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ HSA}$  (40  $\mu\text{L}$ )

Supporting electrolyte:  $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ HAc-NaAc}$ ,  $0.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ NaCl}$  ( $\text{pH}=5.79$ ); Sweep rate:  $50\text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; a glassy carbon working electrode, a platinum auxiliary electrode, and a saturated calomel reference electrode

图 9  $\text{Eu}^{3+}$ -HSA 溶液的循环伏安图

Fig.9 Cyclic voltammetry of  $\text{Eu}^{3+}$  and HSA system

## 3 结 论

通过观察稀土离子对人血清白蛋白的荧光猝灭(图 5)的猝灭直线看到,  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Pr}^{3+}$  在 HSA 分子中至少有两类结合位点。  $\text{Eu}^{3+}$  与 HSA 的强结合位点数为 2,即形成  $\text{Eu}_{276} \cdot \text{HSA}$  复合物,结合常数  $\lg K$  分别为

12.03 和 9.05。  $\text{Pr}^{3+}$  与 HSA 的强结合位点数为 2,即形成  $\text{Pr}_{22} \cdot \text{HSA}$  复合物,结合常数  $\lg K$  分别为 9.89 和 6.97。由此可知稀土离子与 HSA 形成稳定的复合物。循环伏安法(图 9)显示出:当  $c_{\text{HSA}} = 1.8 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $\text{Eu}^{3+}$  的氧化还原峰基本消失,表明在玻碳电极上  $\text{Eu}^{3+}$  和 HSA 之间发生了强烈作用,生成比较稳定的复合物,这与荧光光谱分析的结果相吻合。紫外光谱(图 1)表现出: HSA 在  $279\text{ nm}$  吸收强度随稀土离子的加入逐渐增强,峰位缓慢紫移,而同步荧光光谱(图 6、7)色氨酸残基的最大发射波长都红移,这两者都说明 HSA 内部的疏水结构有所瓦解,肽链的伸展程度增加。CD 光谱(图 8)表明:在  $\text{pH}=6.38$ ,离子强度为  $0.15\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的条件下,  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Pr}^{3+}$  对 HSA 的二级结构影响不大。

## 参考文献:

- [1] Chaudhuri D, Horrocks W D, Amburgey J C, et al. *Biochemistry*, **1997**,**36**(32):9674~9680
- [2] Cheng Y, Chen B, Lu J, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **1998**,**69**(1~2):1~7
- [3] NI Jia-Zuan(倪嘉纘). *Bioinorganic Chemistry of Rare Earth Elements* (稀土生物无机化学). Beijing: Science Press, **1995**.172~197
- [4] LU Ji-Xin(卢继新), ZHANG Gui-Zhu(张贵珠), ZHAO Peng(赵 鹏), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chimica Sinica)*, **1997**, **55**:915~920
- [5] ZHANG Bao-Lin(张保林), WANG Wen-Qing(王文清). *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **1993**,**9**(4):369~373
- [6] LIANG Hong(梁 宏), BIAN He-Dong(边贺东), TU Chu-Qiao(涂楚桥), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **2001**,**22**(1):21~26
- [7] LI Xiao-Jing(李晓晶), ZHANG Shan-Rong(张善荣), ZHANG Shu-Gong(张树功), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1999**,**20**(1):127~131
- [8] LI Xiao-Jing(李晓晶), WANG Zhi-Qiang(王志强), CHEN Ji(陈 继), et al. *Yingyong Huaxue (Chinese Journal of Applied Chemistry)*, **1998**,**15**(1):5~8
- [9] Shahid F, Gomez J E, Birnbqram E R, et al. *J. Biol. Chem.*, **1992**,**257**(10):5618~5625
- [10] LI Lian-Shan(李连山), LI Xiao-Yan(李晓燕). *Fenxi Shiyanshi (Chinese Journal of Analysis Laboratory)*, **2005**,**24**(4):20~23
- [11] YANG Mei-Ling(杨美玲), YANG Pei-Ju(杨培菊), SONG Yu-Min(宋玉民). *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese Journal of*

- Inorgnaic Chemisttry*), **2005**,**21**(4):483~489
- [12]XIE Meng-Xia(谢孟峡), XU Xiao-Yun(徐晓云), WANG Ying-Dian(王英典), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **2005**,**63**:2055~2062
- [13]WANG Jian-Lin(王建林), FU Lian-Chun(付连春), ZHOU Shi-Wu(周实武), et al. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi (Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **2005**,**25**(6):912~915
- [14]YANG Bin-Sheng(杨斌盛), YANG Pin(杨频). *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan(Prog. Biochem. Biophys.)*, **1989**,**16**(5):354~358
- [15]WANG Xing-Ming(王兴明), DONG Fa-Qin(董发勤), DING Li-Sheng(丁立生), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **2004**,**20**(8):920~923
- [16]CHEN Gong-Zhen(陈国珍). *Fluorescence Analytical Method (荧光分析法)*. Beijing: Science Press, **1990**.122 ~189
- [17]ZHANG Bao-Lin(张保林), WANG Wen-Qing(王文清), YUAN Rong-Yao(袁荣尧), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **1994**,**52**:1213~1217
- [18]YANG Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *Theory of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学原理)*. Beijing: Science Press, **2002**.344~363
- [19]ZHANG Xiao-Wei(张晓威), ZHAO Feng-Lin(赵凤林), LI Ke-An(李克安), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1999**,**20**(7):1063 ~1067
- [20]KANG Jing-Wan(康敬万), WU Hai-Xia(吴海霞), ZHUO Lin(卓琳), et al. *Zhongguo Xitu Xuebao(Journal of the Chinese Rare Earth Society)*, **2005**,**23**(4):496~500
- [21]LI Lei(李蕾), LI Xun(李勋), QI Qi(戚琪), et al. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi(Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **2004**,**24**(1):74~77