

紫外照射下 Pb(II)与牛血清白蛋白的相互作用研究

张海蓉¹ 边贺东^{*1} 倪寿海¹ 于 青¹ 梁 宏^{*2} 陈振峰²

(¹ 广西师范大学化学化工学院, 桂林 541004)

(² 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室, 广西师范大学, 桂林 541004)

摘要: 通过紫外吸收光谱法、紫外二阶导数光谱法和荧光光谱法研究了生理 pH 值条件、紫外照射(UV C 253.7 nm)下 Pb(II)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。紫外光谱和紫外二阶导数光谱显示紫外光照射改变了蛋白质中氨基酸残基的微环境。Stern-Volmer 方程和 Lineweaver-Burk 方程分析表明,经紫外光照射后,Pb(II)对 BSA 的荧光猝灭作用依然为静态猝灭作用,且没有改变其强结合位点的位置。受紫外照射过的 BSA 加入 Pb(II)后,BSA 与 Pb(II)的结合常数(K_s)随着照射时间的延长而逐渐降低;而 BSA 与 Pb(II)先混合后照射时,结合常数(K_s)随着照射时间的延长却逐渐升高。

关键词: Pb(II); 牛血清白蛋白; 荧光猝灭; 紫外-可见吸收光谱; 紫外照射

中图分类号: O614.43*3; Q512*1; O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2009)02-0306-06

Interaction of Pb(II) with Bovine Serum Albumin under UV Irradiation

ZHANG Hai-Rong¹ BIAN He-Dong^{*1} NI Shou-Hai¹ YU Qing¹ LIANG Hong^{*2} CHEN Zhen-Feng²

(¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

(²Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources (MOE),

Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: The interaction between Pb(II) and bovine serum albumin (BSA) under the effect of UV C (253.7 nm) irradiation at physiological condition have been investigated by UV spectrum, ultraviolet second-derivative spectroscopy and fluorescence spectrum. The research results indicated that UV C irradiation make the environments of aromatic residues change according to UV spectrum and ultraviolet second-derivative spectroscopy. Stern-Volmer equation and Lineweaver-Burk equation showed that the fluorescence quenching of BSA by Pb(II) is also a static quenching procedure and strong binding site is not change after UV C irradiation. When adding Pb(II) to irradiated BSA, the binding constant (K_s) decreased gradually; while irradiating the mixture of Pb(II)-BSA, the binding constant (K_s) increased.

Key words: Pb(II); BSA; fluorescence quenching; UV-Vis spectra; UV C irradiation

血清白蛋白是人和动物血浆中含量最丰富的蛋白质,在生物体中起着血液缓冲剂、维持血液渗透压、载运等作用,可以和许多金属离子结合;也是药物、脂肪酸、酶、染料、代谢产物、激素等的运送载

体,具有广阔的研究前景^[1]。紫外照射是影响生命物质的一个重要因素,可以使蛋白质变性从而改变蛋白质与其他生命物质的结合。常态下金属离子与血清白蛋白的研究早有报道,如钴与血清白蛋白的平

收稿日期:2008-10-07。收修改稿日期:2008-11-13。

国家自然科学基金(No.20671023,30460153)、教育部重点项目基金(No.03101,204111)及药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室的资助项目。

*通讯联系人。E-mail:gxnuchem312@yahoo.com.cn

第一作者:张海蓉,女,26岁,助教;研究方向:生物无机化学。

衡结合及滞后效应研究^[2-8]。然而,对于在紫外照射下金属离子与血清白蛋白的结合状况的研究甚少^[9]。因此研究紫外线对血清白蛋白与金属离子结合的影响具有重要的理论和现实意义。本文运用紫外-可见光谱、紫外二阶倒数光谱和荧光光谱研究了 Pb(II)与牛血清白蛋白(BSA)在 253.7 nm 紫外光(UV C)照射下的结合情况。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

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

BSA(电泳纯)为 Sigma 公司原装,购自华美生物工程公司,缓冲剂三羟甲基氨基甲烷(Tris)为生化试剂,用前均未做纯化处理。其余试剂均为分析纯试剂。BSA 溶液用前新鲜配制,其浓度用光度法测定,按 278 nm 处 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 在 1 cm 光程时吸光度为 0.667 计算。Pb(NO₃)₂ 的浓度用 EDTA 滴定。所有溶液配制均用二次去离子水(电导率小于 1),均含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 以保持相同的离子强度,并用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl 缓冲溶液保持 pH=7.43(± 0.02)。

1.2 实验过程

1.2.1 高纯水的制备

阴阳树脂按常规方法处理,取普通的一次蒸馏水依次通过阳离子、阴离子、混合型树脂,控制滴速,到水的电导率达到要求为止^[10]。

1.2.2 样品的照射

配制浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液,并将溶液分成 2 份,1 份加入不同浓度的金属离子 Pb(II)溶液,混合均匀,静置 1 h;另 1 份未加入金属离子 Pb(II),2 份同时置于 253.7 nm、20 W 的紫外杀菌灯下进行照射,液面处的光照强度为 $0.3 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。照射完的样品静置 1 h 之后,再将未加金属离子 Pb(II)的蛋白用同样的方法加入不同浓度的金属离子 Pb(II)溶液后混合均匀,静置 1 h 后,2 份样品同时进行光谱测试。实验过程中恒温 25 ℃。

1.2.3 紫外吸收光谱、紫外二阶导数光谱

取照射时间为 1、2、3、4、5、6、7、8 h 的不同浓度比的样品,恒温 25 ℃下用 Cary-100 紫外-可见分光光度计测定紫外光谱,以未照射的相同比值的溶液

作参比溶液,比色池的直径为 1 cm。

1.2.4 荧光光谱的测定

取照射时间为 10、20、30 min 的样品,恒温 25 ℃下用 RF-5301PC 型荧光分光光度计测定荧光光谱。参数设置:荧光激发波长 296 nm;激发光狭缝宽度:5 nm,发射光狭缝宽度:5 nm;比色池的直径为 1 cm。

2 结果与讨论

2.1 紫外吸收光谱和紫外二阶导数光谱分析

分别配置 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}}$ 比值为 1、2、3 的混合溶液,将其同时放置于紫外灯下照射,照射时间为 0、1、2、3、4、5、6、7、8 h。以未经紫外照射的相同比值的溶液作为参比,测定其紫外吸收光谱和紫外二阶导数光谱,如图 1 所示。我们知道,278 nm 附近吸收峰的蓝移表示原来深埋于蛋白质非极性的生色基被较多地暴露于极性溶剂,红移则表示生色基被翻转到极性较小的区域^[11]。

从图 1(a)紫外-可见吸收光谱图可看出,随着照射时间的延长,血清白蛋白的吸光度逐渐增大,其 233 和 283 nm 左右的吸收峰都发生轻微的红移。233 nm 处的吸收主要是由肽键的 C=O 基的 $n-\pi^*$ 跃迁引起,它与蛋白质的 α 螺旋的含量有关;而 283 nm 处的吸收属于 Trp 和 Phe 残基的芳杂环 $\pi-\pi^*$ 跃迁,此处吸收峰发生轻微的红移说明紫外照射使生色基被翻转到极性较小的区域。因此,Pb(II)与 BSA 的混合溶液经紫外照射后,蛋白质中氨基酸残基的微环境发生了部分变化^[11]。

图 1(b)为牛血清白蛋白的紫外二阶导数光谱图,如图所示,230、273 nm 附近的特征峰的正吸收值都随紫外照射时间的延长而逐渐增强并发生轻微的红移;236、303 nm 左右的特征峰的负吸收值也随紫外照射时间的延长而逐渐增强且有轻微的红移。因而紫外光照射使血清白蛋白构象发生变化, α 螺旋的含量减少,肽链相对伸展。色氨酸和酪氨酸残基被翻转到较深的疏水腔中^[11-13]。

根据一级反应动力学方程结合 Beer 定律得 $\ln A = -kt$ (A 为吸光度, t 为反应时间, k 为相应的速率常数),常温下,以 $\ln A$ 对照射时间 t 作图,根据斜率可求得反应的速率常数。图 2 为不同 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}}$ 比值的混合溶液在 UV C 照射下 $\ln A$ 随照射时间的变化, $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}}$ 的比值分别为 2:1、3:1、4:1。根据斜率我们可知反应速率常数 k 分别为 4.057×10^{-5} 、 4.026×10^{-5} 、 $4.071 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$,平均值为 $4.051 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (方差 $S^2 =$

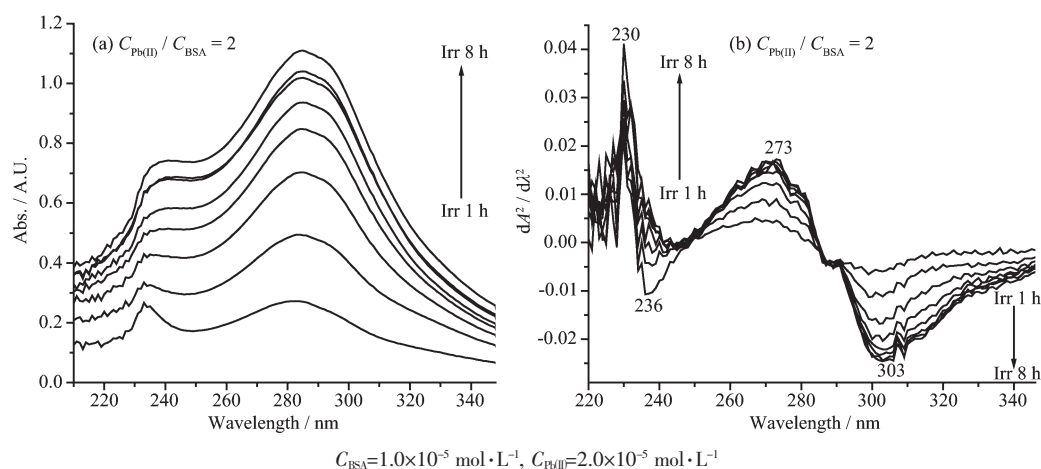


图 1 Pb(II)与 BSA 混合液的紫外吸收光谱和紫外二阶导数光谱

Fig.1 UV absorption spectra (a) and the ultraviolet second-derivative spectra (b) of the mixture of Pb(II) and BSA

0.357×10^{-13})。 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}}$ 比值对紫外照射条件下的反应速率常数影响很小,说明本实验条件下,BSA 构象变化受 Pb^{2+} 影响较小,而受紫外照射的影响较大。

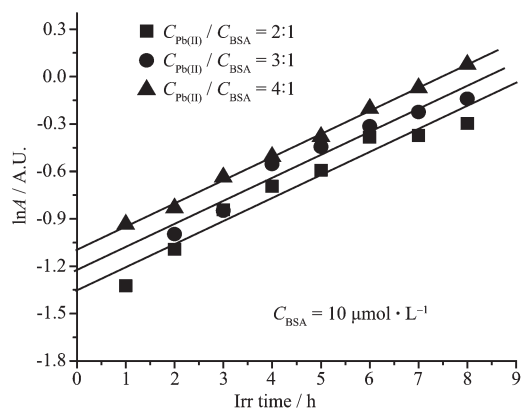
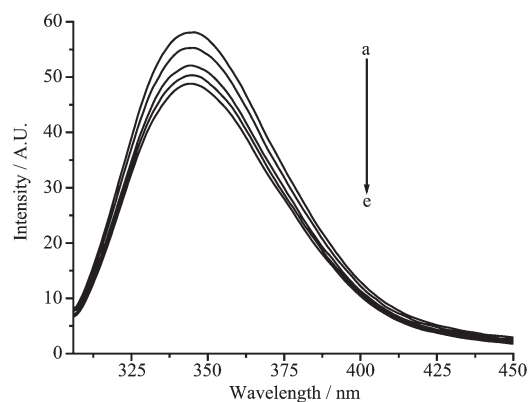
图 2 $\ln A \sim t$

Fig.2 Plots of $\ln A \sim t$

2.2 荧光猝灭光谱分析

图 3 为 pH=7.4 下未经紫外光照射的 BSA ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液加入 Pb(II) 溶液前后的荧光猝灭发射光谱,当用激发波长为 296 nm 激发时,其在 345 nm 处出现蛋白质的特征发射峰。BSA 的构象变化可通过加入 Pb(II) 溶液前后的荧光特征发射峰的强度体现出来。从图 3 中可看出,随着 Pb(II) 浓度的增加,BSA 的荧光发生有规律的猝灭且最大荧光发射峰的位置不变。

图 4(A)、(B) 分别为 BSA 受紫外照射后加入 Pb(II) 和 Pb(II) 与 BSA 先混合再经紫外照射的 Pb(II) 与 BSA 结合的荧光光谱图,由图 4 可知,随着 Pb(II) 浓度的增加,2 个体系中 BSA 的荧光都发生有规律的猝灭且最大荧光发射峰的位置不变。对比图 3、图 4 可知,



(a) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA (b~e) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA in the presence of $1.0, 3.0, 5.0, 7.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pb(II), respectively

图 3 BSA 未照射时加入 Pb(II) 的荧光猝灭图

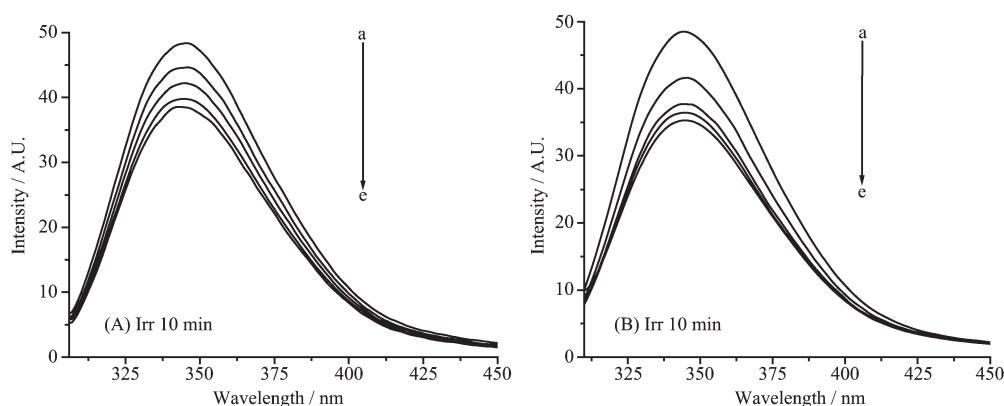
Fig.3 Fluorescent quenching spectra of BSA and Pb(II) without UV C exposure

经紫外照射的 BSA 比未照射过的 BSA 的荧光猝灭程度更大。此结果表明,蛋白质经紫外照射后发生了构象变化,紫外照射使得 BSA 中部分色氨酸残基被破坏^[14],且紫外照射有利于 Pb(II) 与 BSA 结合。

荧光猝灭通常可分为动态猝灭和静态猝灭。若将过程按动态猝灭处理,则蛋白质等荧光体与荧光猝灭剂分子间的相互作用可用 Stern-Volmer 方程进行描述^[15],即:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 C_Q = 1 + K_{sv} C_Q \quad (1)$$

其中, F 为有猝灭剂存在时 BSA 的荧光强度; F_0 为没有猝灭剂存在时 BSA 的荧光强度; C_Q 为猝灭剂的浓度; K_{sv} 为动态猝灭常数,单位是 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$; k_q 为动态荧光猝灭速率常数,它反映了体系中分子的彼



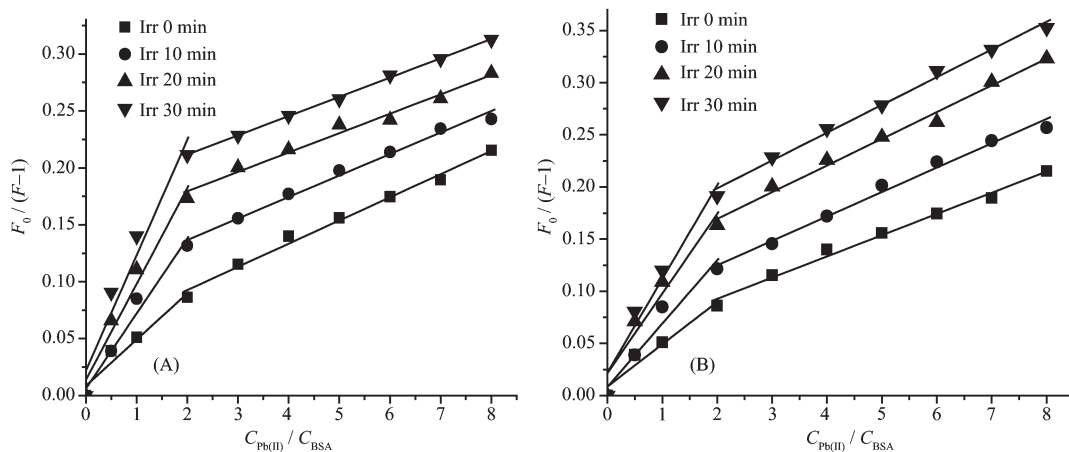
(A) Adding Pb(II) to BSA irradiated by UV C; (B) Mixture of Pb(II) and BSA under UV C irradiation; (a) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA; (b~e) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA in the presence of $1.0, 3.0, 5.0, 7.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pb(II), respectively

图 4 紫外照射下 BSA 与 Pb(II)的荧光猝灭图

Fig.4 Fluorescent quenching spectra of BSA and Pb(II) under UV C (253.7 nm) irradiation

此扩散和相互碰撞对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响, 各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; τ_0 为没有猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命。由于生物大分子的荧光平均寿命约为 $10^{-8} \text{ s}^{[16]}$, 故 $k_q = K_{SV}/\tau_0$ 。

根据 Stern-Volmer 方程, 如图 5 以 $F_0/(F-1)$ 对 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}}$ 作图, 求得动态猝灭速率常数 k_q , 结果列于表 1。由表 1 可知猝灭常数 k_q 都大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 此结果表明经紫外光照射后, Pb(II)对 BSA 的荧光猝灭作用依然为静态猝灭作用。



(A) Adding Pb(II) to BSA irradiated by UV C; (B) Mixture of Pb(II) and BSA under UV C irradiation $C_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 5 紫外照射下 Pb(II)对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Fig.5 Stern-Volmer plots of Pb(II) and BSA under different time of UV C (253.7 nm) irradiation

表 1 Pb(II)-BSA 体系的 k_q 随照射时间的变化

Table 1 Quenching parameters of BSA with Pb(II)

Irradiation time / min	0	10	20	30
$k_q / (10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	2.035 ± 0.005	1.887 ± 0.005	1.702 ± 0.006	1.690 ± 0.001
$k_q / (10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	2.035 ± 0.005	2.340 ± 0.006	2.559 ± 0.006	2.662 ± 0.005

图 5(A)为 BSA 照射 0、10、20、30 min 后加入 Pb(II)溶液混合的 Stern-Volmer 图, 图 5(B)为 BSA 与 Pb(II)混合后照射 0、10、20、30 min 后的 Stern-Volmer 图。由图可知, 经紫外照射后 Pb(II)对 BSA 的荧光猝

灭在 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}} \approx 2$ 处出现一拐点, 说明 Pb(II)与 BSA 结合至少有 2 类结合点存在, 其中强结合部分为 2 个^[17], 且紫外照射并未改变其强结合位点的位置。这可能是由于在生理 pH 下, 咪唑基氮上的氢已完全

失去,使咪唑基氮的配位能力大大增强,Pb(II)主要与 BSA 中的咪唑基氮进行配位^[7]。

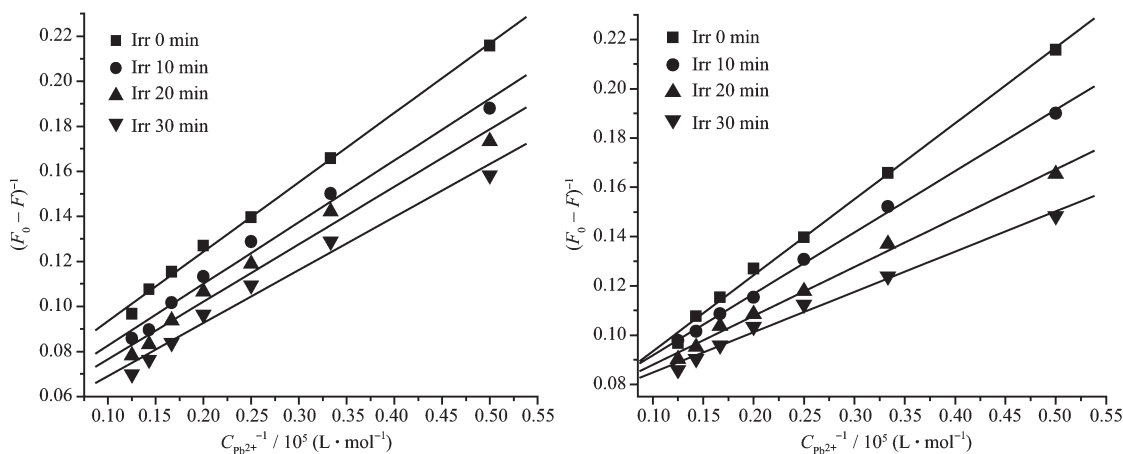
根据图 5 和表 1 可知,当 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}} > 2$ 时,受紫外照射过的 BSA 加入 Pb(II)后,BSA 与 Pb(II)结合的荧光猝灭常数(k_q)随着照射时间的延长而逐渐降低;而 BSA 与 Pb(II)先混合后照射时,BSA 与 Pb(II)结合的荧光猝灭常数(k_q)随着照射时间的延长却逐渐升高。当 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}} < 2$ 时,2 种情况下的荧光猝灭常数(k_q)都逐渐升高。紫外线照射蛋白质时,可使蛋白质发生变性,从而引起氢键、肽键、二硫键等不同程度的断裂,减弱蛋白质的结合能力。但同时紫外光照射也可引起蛋白质的色氨酸的光解,色氨酸光解产生水化电子和自由基^[18],增强蛋白质的结合能力。因此,当 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}} < 2$ 及 Pb(II)与 BSA 混合物在 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}} > 2$ 进行紫外照射时,Pb(II)对 BSA 的荧光猝灭常数(k_q)随着照射时间的延长而增大,可能是由于色氨酸光解产生水化电子和自由基,促进了 Pb(II)与 BSA 的结合。而当 Pb(II)与 BSA 混合物在 $C_{\text{Pb(II)}}/C_{\text{BSA}} > 2$ 进行紫外照射时,紫外照射对 BSA 的变性能力大于色氨酸光解产生的水化电子和自由基对 Pb(II)与 BSA 结合的促进作用。因而荧光猝灭常数随着照射时间的延长而降低。

对于静态猝灭,复合物的结合常数可运用 Lineweaver-Burk 双倒数方程求得, Lineweaver-Burk 双倒数方程为^[17]:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_s^{-1} F_0^{-1} C_Q^{-1} \quad (2)$$

其中, F 为有猝灭剂存在时 BSA 的荧光强度; F_0 为没有猝灭剂存在时 BSA 的荧光强度; C_Q 为猝灭剂的浓度; K_s 为结合常数。以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 C_Q^{-1} 作图,如图 6,根据斜率和截距求得复合物的结合常数 K_s ,结果列于表 2。

图 6 (A) 为 BSA 照射 0、10、20、30 min 后加入 Pb(II)溶液混合的 Lineweaver-Burk 双倒数图,图 6(B) 为 BSA 与 Pb(II)混合后照射 0、10、20、30 min 后的 Lineweaver-Burk 双倒数图。由图 6 和表 2 可知,当 BSA 先照射后加入 Pb(II)时,Pb(II)与 BSA 的结合常数随紫外光照射时间的延长而逐渐降低,说明 Pb(II)与 BSA 的结合能力逐渐减弱。而当 BSA 与 Pb(II)先混合后照射时,其结合常数随紫外光照射时间的延长而逐渐增大,说明 Pb(II)与 BSA 的结合能力逐渐增强。这一结果充分说明紫外光照射可使蛋白质变性,诱导蛋白质构象发生变化,导致 Pb(II)与 BSA 的结合能力减弱,同时也可产生水化电子、自由基等促进 Pb(II)与 BSA 的结合^[18]。两者相互影响,结合能



(A) Adding Pb(II) to BSA irradiated by UV C; (B) Mixture of Pb(II) and BSA under UV C irradiation $C_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 6 紫外照射下 Pb(II)对 BSA 荧光猝灭的 Lineweaver-Burk 图

Fig.6 Plots of Lineweaver-Burk of Pb(II) with BSA

表 2 Pb(II)-BSA 体系的 K_s 随照射时间的变化

Table 2 Binding constants of BSA with Pb(II)

Irradiation time / min	0	10	20	30
$K_s / (10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	2.033 ± 0.002	2.018 ± 0.005	1.999 ± 0.005	1.936 ± 0.005
$K_s' / (10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	2.033 ± 0.002	2.687 ± 0.002	3.438 ± 0.002	4.185 ± 0.002

K_s : Adding Pb(II) to BSA irradiated by UV C; K_s' : Mixture of Pb(II) and BSA under UV C irradiation.

力的强弱取决于哪一种作用占主导地位。

参考文献:

- [1] Carter D C, Ho J X. *Advances in Protein Chemistry, Vol. 45*, in: Schumaker V N(Ed.), San Diego, CA: Academic Press, **1994**.
- [2] Liang H, Huang J, Tu C Q. *J. Inorg. Biochem.*, **2001**,**85**(2~3): 167~171
- [3] BIAN He-Dong(边贺东), LI Mei(李 梅), YU Qing(于 青), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006**, **22**(5):845~850
- [4] Liang H, Tu C Q, Zhang H Z, et al. *Chin. J. Chem.*, **2000**,**18** (1):35~41
- [5] Tian Q L, Liao S H, Lu P, et al. *Chin. J. Chem.*, **2006**,**24**: 1388~1390
- [6] Bian H D, Liang H, Tu C Q, et al. *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2000**,**16**:276~279
- [7] WU Gen-Hua(吴根华), WANG Chun-Hua(汪春华). *Spectro. Spect. Anal.(Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2005**,**25**(2): 246~248
- [8] SONG Yu-Men(宋玉民), WU Jin-Xiu(吴锦绣), ZHENG Xiu-Rong(郑秀荣), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006**,**22**(9):1615~1622
- [9] Bian H D, Zhang H R, Yu Q, et al. *Chin. J. Chem.*, **2007**, **25**:1116~1120
- [10] National Environmental Protection Bureau(国家环保局编著). *Water and Waste Water Monitor Analysis Method, The Third Edition*(水和废水监测分析方法,第三版). Beijing: Chinese Environmental Science Publishing House, **1989**.2~11
- [11] Shahid F, Gomez J E. *J. Biol. Chem.*, **1982**,**257**(10):5618~5622
- [12] LIANG Hong (梁 宏). *J. Guangxi Nor. Univ. (Natural Science)(Guangxi Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban)*, **1995**,**13**(2):48~51
- [13] Andrade J D (Ed.). *Surface and Interfacial Aspectrum Biomedical Polymers*. Plenum Press: New York, **1985**.
- [14] Stepuro I I, Artsukevich A N, Ostrovskii Y M. *Biofizika*, **1981**,**26**(5):777~781
- [15] PAN Zu-Ting(潘祖亭), MA Yong(马 勇), WANG Wei(王 巍). *Chinese J. Anal. Lab.(Fenxi Shiyanshi)*, **2004**,**24**(1):5~8
- [16] YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Ping(杨 频), ZHANG Li-Wei(张立伟). *Chin. Sci. Bull.(Kexue Tongbao)*, **1994**,**39**(1): 31~35
- [17] YANG Bin-Sheng(杨斌盛), YANG Ping(杨 频). *Progress in Biochem. and Biophy. (Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jingzhan)*, **1992**,**12**(2):110~113
- [18] LI Shan-Jun(李善均), JI Cai-Gui(纪才圭). *High Polymer Photochemistry Principle and its Application*(高分子光化学原理及其应用). Shanghai: Fudan University Press, **1993**.433