

# 铜、钠和钼离子与牛血清白蛋白作用的荧光光谱研究

陈晓波, 李 崧

北京师范大学分析测试中心, 应用光学北京重点实验室, 北京 100875

**摘 要** 研究了铜、钠和钼离子对牛血清白蛋白(BSA)的荧光强度的影响。铜离子对牛血清白蛋白荧光有明显的静态猝灭现象, 其离解常数为  $2.38 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。氯化钠对 BSA 溶液的荧光没有影响, 说明生理盐水作为生物系统的体液对生命起到很好的保护作用。而钼离子在小浓度时对牛血清白蛋白荧光静态猝灭比较小, 当钼离子浓度增加到  $8.4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 则呈现出雪崩猝灭现象。

**主题词** 荧光猝灭; 牛血清白蛋白; 金属离子

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)02-0309-04

## 引 言

白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质, 它可以与许多内源性或外源性化合物结合, 在生命体内起着重要的储存和输运作用。这些化合物既可以是有机化合物, 也可以是无机离子, 某些微量金属元素在有关的生物过程中起着极其重要的作用, 因此在分子水平上研究它们在生物体内的作用机理是很有意义的<sup>[1-10]</sup>。本文用荧光光谱方法, 探索铜、钠和钼离子对牛血清白蛋白(BSA)的作用和影响, 研究生命所必须的微量金属元素对其荧光光谱的影响, 对进一步探索金属酶的结构与功能间的关系及药物的作用机理等有关生命问题都有着重要意义<sup>[3-10]</sup>。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Fluorolog-Tau-3 荧光光谱仪(JY-ISA), UV-365 紫外-可见分光光度计, 万分之一天平(Sartorius, BP110 S), 微量移液器。Tris-盐酸缓冲液: pH 7.4; BSA, 北京鼎国生物技术公司产品; 硫酸铜  $\text{CuSO}_4$ , 氯化钠  $\text{NaCl}$ , 钼酸铵  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  均为分析纯。

### 1.2 实验方法

(1)以 pH 7.4 的 Tris-盐酸缓冲液配制  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BSA 溶液(内含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaCl}$  以维持离子强度), 在一系列 5 mL 的试管中加入一定体积(3 mL)的 BSA

溶液, 使 BSA 的量固定, 然后在一部分试管中滴入  $6 \mu\text{L}$  的  $7.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{CuSO}_4$  一滴至数滴, 摇匀, 配制成了  $\text{CuSO}_4$  浓度为一倍至数倍于  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液; 然后再静置数小时后, 观测随 Cu 离子浓度的增加, BSA 溶液的内源荧光强度的变化。

(2)以 pH 7.4 的 Tris-盐酸缓冲液配制  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BSA 溶液, 在一系列 5 mL 的试管中加入一定体积(3 mL)的 BSA 溶液, 使 BSA 的量固定, 然后在一部分试管中滴入  $10 \mu\text{L}$  的  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaCl}$  一滴至数滴, 摇匀, 配制成了  $\text{NaCl}$  浓度为一倍至数倍于  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液; 然后再静置数小时后, 观测随 Na 离子浓度的增加, BSA 溶液的内源荧光强度的变化。

(3)用与(1)相同的方法配制了 BSA 溶液, 在一系列 5 mL 的试管中加入一定体积(3 mL)的 BSA 溶液, 使 BSA 的量固定, 然后在一部分试管中滴入  $6 \mu\text{L}$  的  $7.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  一滴至数滴, 摇匀, 配制成了  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  浓度为一倍至数倍于  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 即 Mo 离子浓度为一倍至数倍于  $1.05 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。接着在另外的一系列 5 mL 的试管中加入一定体积(3 mL)的 BSA 溶液, 使 BSA 的量固定, 然后在一部分试管中滴入  $10 \mu\text{L}$  的  $9 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  一滴至数滴, 摇匀, 配制成了  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  浓度为一倍至数倍于  $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 即 Mo 离子浓度为一倍至数倍于  $2.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别静置数小时后, 观测随较浓的 Mo 离子浓度的增加, BSA 溶液的内源荧光强度的变化。

收稿日期: 2004-01-06, 修订日期: 2004-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目和教育部留学回国人员科研启动基金资助

作者简介: 陈晓波, 1963年生, 北京师范大学分析测试中心教授

## 2 结果与讨论

### 2.1 动态猝灭与静态猝灭

当荧光体 BSA 与猝灭体 (Cu, Na, Mo 离子) 由于热运动等发生碰撞时, 可引起荧光体的荧光猝灭, 设想为动态猝灭, 则这种动态猝灭服从 Stern-Volmer 方程<sup>[3-5]</sup>

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (1)$$

其中  $F_0$  为猝灭体不存在时 BSA 的荧光强度,  $F$  为加入猝灭体后的荧光强度,  $K_q$  为双分子猝灭常数,  $[Q]$  为猝灭体浓度,  $\tau_0$  为猝灭体不存在时荧光体的荧光寿命,  $K_D$  为 Stern-Volmer 常数

$$K_D = K_q \tau_0 \quad (2)$$

当荧光体与猝灭体之间形成不发荧光的复合物时, 或者出现无辐射能量转移时, 根据化学平衡关系可得静态猝灭服从的关系为

$$F_0/F = 1 + K_s [Q] \quad (3)$$

$K_s$  为荧光体与猝灭体之间的结合常数。对于静态猝灭通常采用 Lineweaver-Burk 双倒数函数关系<sup>[3-5]</sup>, 即由 (3) 式变形可得

$$F_0/(F_0 - F) = 1 + K_d (1/[Q]) \quad (4)$$

$K_d$  为离解常数

$$K_d = 1/K_s \quad (5)$$

### 2.2 铜离子对 BSA 荧光的猝灭研究

在室温下, 纯 BSA 在 290.9 nm 处有最大激发峰, 荧光发射峰则在 353.1 nm 处, 该发光特征是由于 BSA 的 134 和 212 位的色氨酸残基的发光所致。当向该溶液滴加  $\text{CuSO}_4$  时, 激发峰和发射峰没有移位, 但发射峰强度明显地减弱, 出现典型的荧光猝灭现象, 结果如图 1 所示。根据公式 (1), 将  $F_0/F$  对所加入的铜离子的总浓度  $[\text{Cu}]$  作图, 得到铜离子对牛血清白蛋白荧光的 Stern-Volmer 猝灭曲线, 结果如图 2 所示, 由图 2 可以看出, Cu-BSA 的 Stern-Volmer 猝灭曲线是一条很好的直线, 它在纵轴上的截距很接近于 1。根据

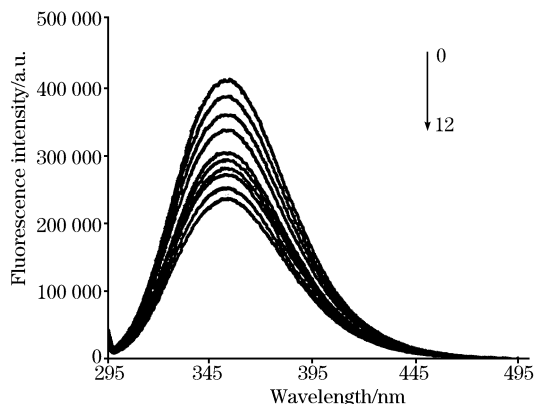


Fig. 1 The fluorescence of BSA quenched by Cu ion

The concentration of BSA is  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , the concentrations of Cu ion are 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12 times the of BSA respectively

动态猝灭理论, 由图 2 的斜率 0.060 4 可以算出  $K_D = 4.03 \times 10^3 (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ , 由于生物分子的荧光寿命约为 10 ns 数量级<sup>[10]</sup>, 由 (2) 式即可得到 Cu 离子的表观猝灭常数  $K_q = 4.03 \times 10^{12} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ 。我们知道, 各种猝灭剂对生物分子的最大扩散碰撞猝灭常数约为  $2.0 \times 10^{10} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ <sup>[7]</sup>, 显然铜离子对牛血清白蛋白的表观猝灭常数  $K_q$  远大于扩散控制的猝灭常数  $2.0 \times 10^{10} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ , 所以 Cu-BSA 体系的猝灭过程不是因为分子扩散和碰撞所引起的动态猝灭, 而是分子之间结合形成了化合物所引起的静态猝灭。

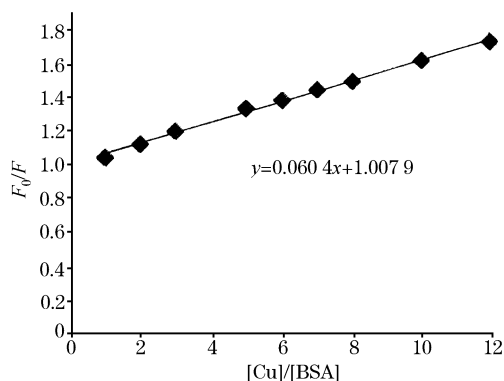


Fig. 2 The Stern-volmer curve of BSA quenched by Cu ion

The concentration of BSA is  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the concentration of Cu ion varied from  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $1.8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

根据静态猝灭理论的公式 (4), 将  $F_0/(F_0 - F)$  对所加入的铜离子的总浓度的倒数  $[\text{Cu}]^{-1}$  作图, 得到铜离子对牛血清白蛋白荧光的 Lineweaver-Burk 猝灭曲线, 结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, Cu-BSA 的 Lineweaver-Burk 猝灭曲线是一条很好的直线, 它在纵轴上的截距很接近于 1, 说明与公式 (4) 的理论吻合得很好。根据该静态猝灭理论, 由图 3 的斜率 15.9 可以算出离解常数  $K_d = 2.38 \times 10^{-4} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ , 荧光体与猝灭体之间的结合常数  $K_s = 4.20 \times 10^3 (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ 。

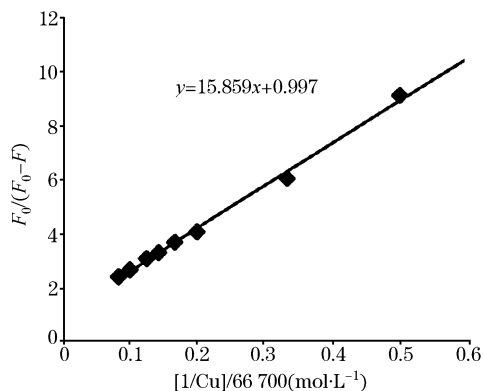


Fig. 3 The lineweaver-burk curve of BSA quenched by Cu ion

### 2.3 钠离子对 BSA 荧光的作用研究

同样在室温下,对 pH 7.4 的 Tris-盐酸缓冲液中的 BSA 溶液滴加氯化钠,观察 Na-BSA 体系的荧光猝灭情况,其 Stern-Volmer 猝灭曲线的结果如图 4 所示。有趣的是在 BSA 溶液中滴加氯化钠的结果不仅没有造成荧光猝灭,反而还使荧光略有增加。图 4 的结果首先说明氯化钠对 BSA 溶液没有荧光猝灭作用,进而还说明氯化钠的加入进一步改善了 Tris-盐酸缓冲液的物化性能,其通透性(透明度)、溶解度等都进一步改善,导致了 BSA 的荧光略有提高。这也说明生理盐水作为生物系统的体液对生命起到很好的保护作用。

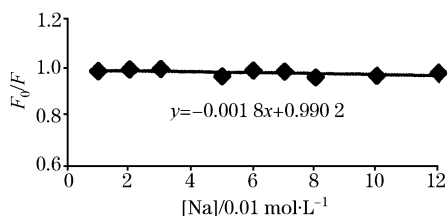


Fig. 4 The stern-volmer curve of Na-BSA system

### 2.3 钼离子对 BSA 荧光的猝灭研究

同样也在室温下,对 pH 7.4 的 Tris-盐酸缓冲液中(内含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl)的 BSA 溶液(浓度为  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )滴加钼酸铵,观察 Mo-BSA 体系的荧光猝灭情况,其 Stern-Volmer 猝灭曲线的结果如图 5 所示,它与图 2 的 Cu-BSA 的结果类似。根据动态猝灭理论,由图 5 的斜率 0.0018 可以算出  $K_D = 8.40 \times 10^2 (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ ,由于生物分子的荧光寿命约为 10 ns 数量级<sup>[10]</sup>,由(2)式即可得到 Mo 离子的表观猝灭常数  $K_q = 8.40 \times 10^{11} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ 。各种猝灭剂对生物分子的最大扩散碰撞猝灭常数约为  $2.0 \times 10^{10} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ <sup>[7]</sup>,显然钼离子对牛血清白蛋白的表观猝灭常数  $K_q$  远大于此,所以 Mo-BSA 体系的猝灭过程不是因为分子扩散和碰撞所引起的动态猝灭,而是分子之间结合形成了化合物所引起的静态猝灭。

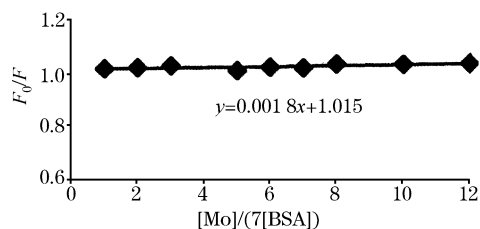


Fig. 5 The stern-volmer curve of BSA quenched by Mo ion

The concentration of BSA is  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the concentration of Mo ion varied from  $1.05 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $1.26 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

把  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  分子中 Mo 离子的浓度从 7 到 84 倍的 BSA 的浓度提高到 140 到 1400 倍的 BSA 的浓度,即把钼离子的浓度从  $1.05 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $1.26 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围提高到  $2.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $2.1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围,继续观察 Mo-BSA 体系的荧光猝灭情况,实验结果如图 6 和图 7 所示。图 6 是 BSA 荧光强度随 Mo 离子浓度变化的情况,图 7 是其 Stern-Volmer 猝灭曲线。从图 6 和图 7 可以看出,在 Mo 离子约为  $8.4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,BSA 荧光强度急剧下降,BSA 的荧光基本上完全被猝灭了,呈现出雪崩猝灭现象。对这类现象的深入研究,对于保护生命是很有意义的。

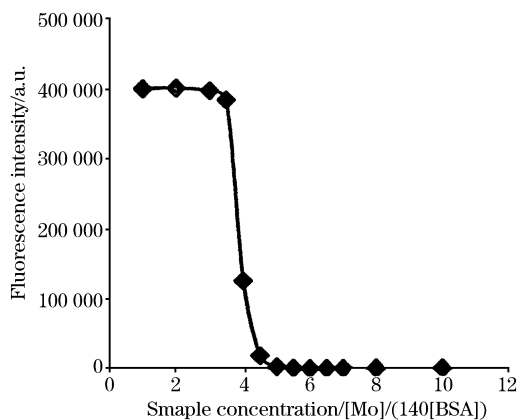


Fig. 6 The dependence of BSA fluorescence on the concentration of codoped Mo ion when excited by 290.9 nm light

The concentration of BSA is  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , the concentration of Mo ion varied from  $2.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $2.1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

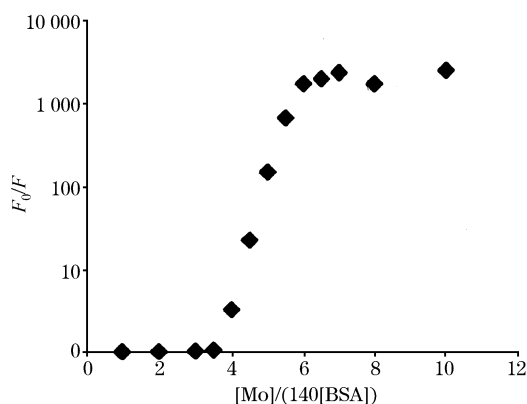


Fig. 7 The Stern-Volmer curve of BSA quenched by Mo ion  
The concentration of BSA is  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , the concentration of Mo ion varied from  $2.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $2.1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

## 参 考 文 献

- [ 1 ] HUANG Ben-li(黄本立). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(2): 129.
- [ 2 ] ZHOU Ya-qin, SONG Zeng-fu, XIAO Mei-ying, et al(周雅琴, 宋增福, 肖枚英, 等). Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis(北京大学学报(自然科学版)), 1996, 32(1): 53.
- [ 3 ] MA Gui-bin, YANG Pin(马贵斌, 杨 频). Chinese Biochemical Journal(生物化学杂志), 1992, 8(5): 624.
- [ 4 ] YANG MAN-man, YANG Pin(杨曼曼, 杨 频). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [ 5 ] YU Tian-zhi, TAO Zu-yi(俞天智, 陶祖贻). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(3): 453.
- [ 6 ] WANG Jing-yan, ZHU Shen-geng, XU Chang-fa(王镜岩, 朱圣庚, 徐长法). Biochemistry(生物化学). Higher Education Press(高等教育出版社), 2003.
- [ 7 ] Ware W R. J. Phys. Chem., 1962, 66: 455.
- [ 8 ] HU Jie-han, TAO Li-mei, ZHANG Yu-xin(胡皆汉, 陶丽梅, 张玉新). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1994, 14(3): 45.
- [ 9 ] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analysis Method(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [10] Lakowicz J R, Weber G. Biochemistry, 1973, 12: 4161.

## Fluorescence Spectroscopy Study of Bovine Serum Albumin Quenched by Metal Ion

CHEN Xiao-bo, LI Song

Applied Optics Beijing Area Major Laboratory, Analytic and Testing Center, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

**Abstract** The fluorescence spectrum of bovine serum albumin (BSA) influenced by copper ion, sodium ion and molybdenum ion is studied. The copper ion leads to obvious statistic quenching of BSA fluorescence. The dissociation constant of copper ion from BSA is about  $2.38 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . NaCl does not have quenching action on BSA fluorescence. It was illustrated that physiological saline, acting as the body fluid of organism, has very good protection action for life. The molybdenum ion has small statistic quenching effect on BSA fluorescence when its concentration is small. However, a new kind of avalanche quenching phenomenon occurs when the concentration of molybdenum ion is about  $8.4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Keywords** Fluorescence quenching; Bovine serum albumin (BSA); Metal ion

(Received Jan. 6, 2004; accepted Mar. 7, 2004)