

光谱法研究钙红-Cu(II)络合物与蛋白质的相互作用及其应用

陈丹丹¹, 张涛¹, 任丽萍^{1*}, 石登荣², 于金莲²

1. 中国农业大学理学院应用化学系, 北京 100094

2. 上海师范大学旅游学院环境科学与工程系, 上海 200234

摘要 研究了钙红-Cu(II)络合物与牛血清蛋白(BSA)作用的共振光散射光谱(RLS)、荧光光谱和电子吸收光谱特征,建立了利用金属配合物作为探针测定痕量蛋白质的方法。钙红-Cu(II)-BSA三元络合物的形成导致RLS强度和荧光强度的增大;同时引起电子吸收光谱的强度减小,594 nm处吸收峰消失。在pH5.65~5.75的酸度条件下,钙红-Cu(II)络合物与BSA系统在317 nm处有一增强的RLS光谱峰,且增强的RLS强度与BSA的浓度呈线性关系。在实验室确定的优化条件下,RLS强度与BSA浓度的线性范围为0.75~10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,线性方程为 $I=150.88+201.48c(\text{BSA}, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$,相关系数 $r=0.9973$ 。方法检出限为 $5.62 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。该方法成功地用于人工混合样品中BSA含量的测定。对钙红-Cu(II)络合物与BSA的作用机制的研究表明,钙红-Cu(II)络合物与BSA之间主要存在的是静电引力。

主题词 钙红-Cu(II)络合物;牛血清蛋白;光谱法;作用机理

中图分类号: O655 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)04-0686-04

引言

蛋白质是生物体的重要组成部分,是生命活动的物质基础。研究蛋白质与小分子探针之间的作用机理和改进蛋白质的分析方法在生命科学和医学临床检验领域中有十分重要的意义^[1-3]。从目前来看,蛋白质探针大致可分三类:染料探针^[4]、金属探针^[5]和金属络合物探针^[6]。前两者已较多地用于蛋白质定量分析,金属络合物探针反应以灵敏度高、稳定性好逐渐引起了人们的重视。

钙红,即钙试剂羧酸钠盐,是一种有机染料(见图1)。钙红作为染料探针与蛋白质结合的作用机理及定量测定已有研究^[7,8],但钙红以染料金属络合物探针与蛋白质结合的作用机理研究却未见报道。本文首次利用RLS光谱、荧光光谱和电子吸收光谱研究了钙红-Cu(II)络合物与BSA的作用机理,并建立了钙红-Cu(II)络合物作为探针测定痕量蛋白质的方法。我们在研究中发现,钙红-Cu(II)络合物与痕量BSA作用可使体系RLS、荧光光谱和吸收光谱发生明显的变化。在pH5.65~5.75条件下,其RLS增强的程度与BSA的浓度有线性关系。据此建立了一种简单、灵敏和快速定量测定BSA的方法,并探讨了钙红-Cu(II)络合物与BSA相互作用的机理。

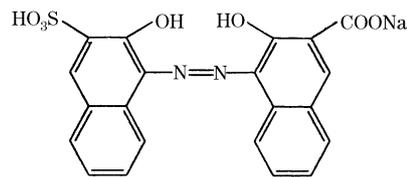


Fig. 1 Structure of cal-red

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司);pHS-3C 型酸度计(上海雷磁厂);Tu-1901 型紫外分光光度计(普析通用公司)。

BSA 储备液:牛血清蛋白(BSA,中国联星实业有限公司)用二次蒸馏水溶解并定容,操作液质量浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,并于 4°C 下保存。 CuSO_4 储备液: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (北京化工厂)用二次蒸馏水溶解定容,操作液浓度 $0.020 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。钙红储备液:(钙试剂羧酸钠,北京瀛海精细化工厂)用二次蒸馏水溶解定容,操作液浓度 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。所用试剂均为分析纯,试验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在10 mL比色管中依次加入0.50 mL钙红溶液,0.70

收稿日期:2005-09-28,修订日期:2005-12-18

基金项目:国家自然科学基金(30270786)资助项目

作者简介:陈丹丹,女,1981年生,中国农业大学理学院应用化学系在读研究生 * 通讯联系人

mL CuSO_4 溶液, 一定量的 BSA 溶液, 以二次蒸馏水定容 10 mL。混匀后将溶液于 $\lambda_{\text{em}} = \lambda_{\text{ex}}$ 处进行同步扫描, 可得 RLS 光谱, 在 RLS 峰 317 nm 处测定溶液的 RLS 强度。设定激发波长为 496 nm, 在 200~900 nm 波长范围内扫描体系的荧光光谱。发射及激发狭缝宽度(带通)均为 10 nm。用 TU-1901 紫外-可见分光光度计测定其吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 RLS 光谱和荧光光谱特征

图 2 为体系的 RLS 散射光谱(曲线 1-3)和荧光光谱(曲线 4-6)。从 RLS 光谱来看, 单纯的 BSA 溶液(图 2, 1)的 RLS 信号十分微弱。钙红-Cu(II)络合物(图 2, 2)有一定强度的 RLS 信号, 加入 BSA 之后, 信号增强, 且在 317 nm 处有最大散射光强度(图 2, 3)。共振峰的特征受 pH 值、 CuSO_4 浓度、钙红浓度及离子强度的影响。RLS 在一定的 BSA 浓度范围内, 随 BSA 浓度的增大而加强, 并且在 317 nm 处 RLS 强度与 BSA 有良好的线性关系, 故可以选择 RLS 光谱来对 BSA 进行定量分析, 选择 317 nm 处为 BSA 测定的工作波长。

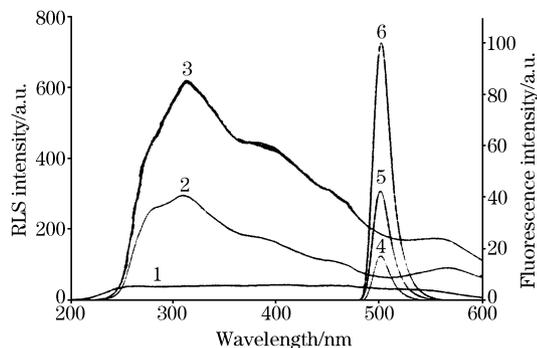


Fig. 2 Resonance light scattering spectra (curve 1-3) and fluorescence spectra (curve 4-6)

- 1, 4: $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA;
2, 5: Cal-red ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + CuSO_4 ($0.0014 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$);
3, 6: $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA + Cal-red ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + CuSO_4 ($0.0014 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)

从荧光光谱来看, BSA 分子中(图 2, 4)因含色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基而发射一定强度的内源荧光^[8], 最大发射波长在 501 nm 处; 钙红-Cu(II)因形成络合物而产生一定的荧光(图 2, 5), 加入 BSA 之后(图 2, 6), 荧光强度增强, 但不属于简单的强度叠加。这可能是钙红与 Cu(II)络合后, 尚有能力与 BSA 结合, 从而使三元络合物的荧光光谱与二元络合物相叠, 而强度增强, 可见发光中心仍为钙红-Cu(II)络合物, BSA 的加入可能抑制溶剂的碰撞去活化作用(内转换作用)而荧光得到增强。

2.2 电子吸收光谱

实验还研究了体系的电子吸收光谱, 如图 3。由图可知, 钙红与 BSA 之间是可以形成二元络合物的, 此时 BSA 的质子化氨基与钙红既可以通过磷酸基缔合也可以通过羧基缔

合, 这种缔合的协同作用使缔合物 π 电子体系 $\pi - \pi^*$ 跃迁的能级间隔显著减小, 因而引起 λ_{max} 产生一定程度的红移 (594, 558 nm)^[9]。加入 CuSO_4 之后, 破坏了这种协同作用, 使体系的紫外吸收明显下降, 且 594 nm 处的吸收峰消失, 表明 CuSO_4 的加入使钙红与 BSA 的结合发生了变化, 生成了新物质, 证明了钙红-Cu(II)-BSA 体系 RLS 强度的增强确实是因为生成了三元络合物的原因。

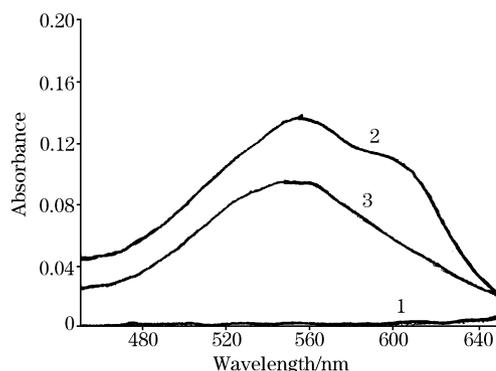


Fig. 3 Absorption spectra

- 1: $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA + CuSO_4 ($0.0014 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$);
2: $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA + Cal-Red ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);
3: $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA + Cal-red ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + CuSO_4 ($0.0014 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)

2.3 实验条件优化

2.3.1 pH 的影响

按实验方法, 用 tris-HCl 缓冲溶液调节溶液的 pH 值, 发现溶液在近中性和弱碱性条件下, 钙红-Cu(II)络合物-BSA 体系的 RLS 强度 (I_{RLS}) 较小, 且不稳定。我们推测, I_{RLS} 的变化可能是由于 BSA ($pI = 4.8 \sim 4.9$) 侧链上的质子化氨基与 CuSO_4 和钙红 ($pK_2 = 3.8$, $pK_3 = 9.4$) 形成的络合物以静电作用结合导致的电子离域化所致^[7, 9]。因此, 随着 pH 值的增大, BSA 质子化能力降低, 从而影响与 $\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2^{2-}$ 的结合; pH 值增大到一定程度, 溶液还出现混浊, 可能是由于溶液的碱性较强生成 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀的缘故。同时, 在酸性条件下, 体系 I_{RLS} 的 RLS 强度有所增强, 但钙红-Cu(II)络合物的 RLS 强度 (I_{RLS}) 也增大, 使得钙红-Cu(II)络合物和钙红-Cu(II)络合物-BSA 体系的 RLS 强度差值 (ΔI_{RLS}) 却减少。这可能是由于缓冲溶液能与钙红-Cu(II)络合物结合, 导致 I_{RLS} 提高。所以本实验采用在溶液中不加入缓冲溶液, 仅用一定量 CuSO_4 溶液稳定溶液的 pH 值变化范围在 5.65~5.75 之间, 便可得到稳定的三元络合物体系, 反应的灵敏度高。

2.3.2 试剂加入顺序和温度的影响

实验发现试剂的加入顺序对体系的 RLS 影响不大, 但以钙红- CuSO_4 -BSA 的加入顺序得到的共振散射光谱稳定性为最佳。

实验研究了不同温度下, 体系的 RLS 强度。实验表明: 在 0~40 $^{\circ}\text{C}$, 钙红-Cu(II)络合物都能与 BSA 快速作用, 体系的 RLS 强度在 5 min 之内达到最大, 且在 4 h 之内保持稳定。

2.3.3 钙红最佳用量的选择

考察了不同量钙红对体系 RLS 强度的影响, 结果见图 4。当钙红浓度较小时, 体系的 I_{RLS} 较小, 这是由于 BSA 不能与钙红-Cu(II) 络合物充分结合。当钙红的浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 体系的 RLS 最大。继续增大钙红的浓度, 体系的 I_{RLS} 减少, 这是因为钙红本身的光吸收使光散射强度减弱。所以实验中钙红的用量选为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 适宜的钙红加入体积为 0.50 mL。

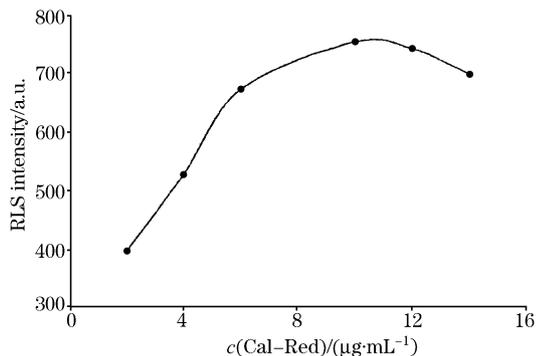


Fig. 4 Effect of concentration of Cal-Red on the RLS intensity (BSA: $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

2.3.4 CuSO_4 最佳用量的选择

考察了不同量 CuSO_4 对体系 RLS 强度的影响, 结果见图 5, 可以看出当 CuSO_4 的用量 $1.4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的 RLS 最大, 继续增加 CuSO_4 用量, 体系的 I_{RLS} 减弱明显, 这可能是因为过量的 Cu^{2+} 与 BSA 质子化的氨基对 $\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2^{2-}$ 产生竞争吸附。所以实验中 CuSO_4 浓度选为 $1.4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 适宜的 CuSO_4 加入体积为 0.70 mL。

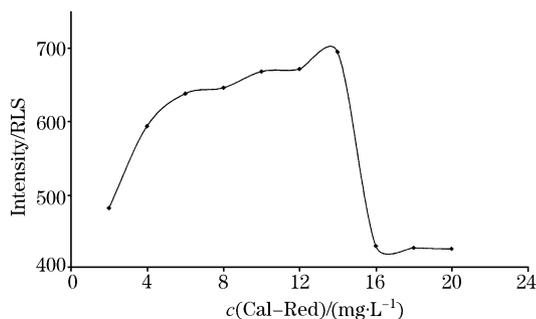


Fig. 5 Effect of concentration of CuSO_4 on the RLS

2.3.5 离子强度的影响

本实验以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钠溶液控制离子强度, 测定了离子强度对体系 RLS 的影响。结果表明, 随着加入氯化钠浓度的增大, 体系的 RLS 强度有所下降, 这可能是由于带电离子对钙红-Cu(II) 络合物和蛋白质电荷存在屏蔽作用, 以及阴离子对蛋白质正电荷部位的竞争作用所致, 这表明钙红-Cu(II) 络合物与 BSA 之间主要存在静电作用。因此实验中应尽量避免以电解质作为缓冲溶液。

2.3.6 共存物质的干扰

在 $c(\text{BSA}) = 2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 5.72 考察了多种共存物质对测定结果的影响(见表 1), 结果表明在本实验条件下,

实验中选择的物质对 BSA 的测定影响不大。

2.3.7 线性范围、检出线与精密度的测定

在确定的最佳条件下, 测定了 BSA 的线性范围, 当 BSA 浓度为 $0.75 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 系统的 RLS 强度与 BSA 浓度呈线性关系, 其线性回归方程为 $I = 201.48c(\text{BSA}, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) + 150.88$, 相关系数 $r = 0.9973$ 。取 10 次试验的空白样品进行平行测定, 将其标准偏差值的 3 倍除以方程的斜率(即 $3S_0/K$)计算检出限, 得到该方法的检出限为 $5.62 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对 10 份含有 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BSA 标准溶液进行了精密度检验, 其相对标准偏差为 2.7%。

Table 1 Interference of foreign substances

干扰物质	存在浓度/ $(10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	相对误差/%
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	4.0	-5.2
BaCl_2	20.0	5.9
AlCl_3	4.0	-3.2
MnSO_4	1.0	-3.0
KCl	4.0	-3.3
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	4.0	5.4
D-果糖	8.0	4.9
D-葡萄糖	10.0	-0.65
L-赖氨酸	0.4	-2.7

2.3.8 人工混合样品中 BSA 含量的测定

根据干扰实验的结果, 配制了三种不同浓度水平的 BSA 合成样品进行测定, 测定结果令人满意(见表 2)。

Table 2 The result of determination in synthesis samples^a

样品中 BSA 的量 / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	检出值 / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	相对标准偏差 /%($n=5$)
1.00	0.96	96.0	1.5
5.00	4.84	96.8	1.8
10.00	9.45	94.5	1.6

^a人工混合样品中的共存物质: D-葡萄糖: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; L-赖氨酸: $4.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$: $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; KCl: $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3 结论

探讨研究蛋白质和各类物质相互作用机理是蛋白质研究的一个重要领域。一般认为, 蛋白质与其他物质的作用方式有静电引力、范德华力和氢键等。本实验用 RLS 光谱、荧光光谱和电子吸收光谱研究钙红-Cu(II) 络合物与 BSA 的相互作用机理。研究表明, 钙红-Cu(II) 络合物与 BSA 主要是通过静电引力结合, 钙红-Cu(II) 络合物在 BSA 表面聚集, 彼此间存在强静电结合及大结合数所导致的高度的电子离域化, 从而使 RLS 和荧光强度增大。在钙红和 BSA 体系中加入 CuSO_4 溶液, 导致体系的紫外吸收明显下降, 且 594 nm 处的吸收峰消失, 证明了钙红-Cu(II)-BSA 三元络合物的形成。

在实验确定的条件下, 钙红-Cu(II) 络合物-BSA 体系的 RLS 强度与 BSA 的浓度成线性关系。该反应灵敏度高, 检出

限低, 操作简便, 反应条件容易控制, 在人工合成样品中的回收率令人满意。鉴于人、牛血清蛋白的氨基酸组份极其相似^[10], 所以用钙红-Cu(II)络合物作为蛋白质的光谱探针试剂有望成为实际分析应用的方法。

参 考 文 献

- [1] Liu S F, Yang J H, Wu X, et al. *Luminescence*, 2004, 19(6): 352.
- [2] ZHANG Qun, SHEN Yu-hua, XIE An-jian, XIA Bing(张 群, 沈玉华, 谢安建, 夏 兵). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2002, 22(2): 267.
- [3] Hu Y J, Liu Y, Shen X S, et al. *Journal of Molecular Structure*, 2005, 738: 143.
- [4] ZHONG Hui, LI Na, ZHAO Fenglin, et al. *Talanta*, 2004, 62: 37.
- [5] CHEN Yue-hua, LIU Zhong-fang, HU Xiao-li, LIU Shao-pu(陈粤华, 刘忠芳, 胡小莉, 刘绍璞). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2005, 33: 802.
- [6] JIA Run-ping, DONG Li-jun, LI Qian-feng, et al. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 442: 249.
- [7] Dong L J, He J, Li Q F, et al. *Analytical Biochemistry*, 2003, 315: 22.
- [8] YAN Cheng-nong, ZHANG Hua-xin, JU Xiang, et al(颜承农, 张华新, 鞠 香, 等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2005, 33(6): 759.
- [9] WEI Yong-ju, LI Ke-an, TONG Shen-yang(魏永巨, 李克安, 童沈阳). *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 1994, 15(10): 1470.
- [10] HU Qiu-luan, LI Ke-an(胡秋鸾, 李克安). *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis(北京大学学报·自然科学版)*, 1999, 35(6): 850.

Study on the Spectra of Cal-Red-Cu(II) Complex with Bovine Serum Albumin and Its Analytical Application

CHEN Dan-dan¹, ZHANG Tao¹, REN Li-ping^{1*}, SHI Deng-rong², YU Jin-lian²

1. Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China

2. Department of Environmental Science and Engineering, College of Tourism, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract The Resonance light scattering (RLS) spectra, fluorescence spectra, and absorption spectra of Cal-Red-Cu(II) metal complex with bovine serum albumin(BSA) were studied. As the Cal-Red-Cu(II)-BSA complex formed, the RLS spectra and fluorescence spectra enhanced, but the absorption spectra weakened and the absorption peak at 594 nm disappeared. At pH 5.65-5.75, the enhanced RLS of Cal-Red-Cu(II) metal complex with BSA system was characterized by the maximum scattering at 317 nm, and the RLS intensity is proportional to the concentration of BSA. Under optimal conditions, the linear range of calibration was 0.75-10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the linear regression equation was $I = 150.88 + 201.48c(\text{BSA}, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ with $r = 0.9973$, and the limit of detection was $5.62 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The method was applied to the determination of BSA in synthetic samples satisfactorily. A mechanism of electrostatic force was suggested for the interaction between BSA and Cal-Red-Cu(II).

Keywords Cal-Red-Cu(II) complex; Bovine serum albumin; Spectra; Interaction mechanism

(Received Sep. 28, 2005; accepted Dec. 18, 2005)

* Corresponding author