

尼古丁与 BSA 相互作用的光谱研究

陈 韵, 孔祥荣, 沈星灿, 梁 宏*

广西师范大学无机化学研究所, 生物化学化工学院, 广西 桂林 541004

摘 要 用紫外-可见光谱和荧光光谱研究了尼古丁与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的相互作用。荧光研究表明, 尼古丁浓度的增加引起 BSA 345 nm 处荧光有规律地猝灭。Stern-Volmer 方程分析 pH 5.0, pH 7.4 和 pH 11.0 体系的荧光猝灭机理发现, pH 5.0 体系属动态猝灭, 而 pH 7.4 和 pH 11.0 体系为静态猝灭。Lineweaver-Burk 双倒数方程计算 pH 7.4 和 pH 11.0 体系在温度为 20 和 37 °C 条件下尼古丁和 BSA 的结合常数 k 分别为: $k_{20\text{ }^\circ\text{C}} = 140.15 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $k_{37\text{ }^\circ\text{C}} = 131.83 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (pH 7.4) 和 $k_{20\text{ }^\circ\text{C}} = 141.76 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $k_{37\text{ }^\circ\text{C}} = 27.79 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (pH 11.0), 表明结合常数在 pH 7.4 条件下受温度的影响要比 pH 11.0 条件下小, 推测是由于不同 pH 下尼古丁存在的不同形态所致。紫外-可见光谱研究表明, pH 7.4 条件下尼古丁浓度的增加引起 BSA 在 210 nm 处吸收峰吸收强度减小且红移, 说明 BSA 二级结构发生变化, 即螺旋结构变松散; 紫外二阶导数光谱和同步荧光光谱 ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 60 \text{ nm}$) 分析尼古丁对 BSA 芳香性氨基酸(Trp, Tyr 和 Phe)残基微环境的变化, 结果表明高浓度的尼古丁使所有这些芳香性氨基酸残基微环境由疏水环境转变为亲水环境。

主题词 尼古丁; 血清白蛋白; 光谱研究

中图分类号: 512⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)10-1652-06

引 言

尼古丁(Nicotine)又称烟碱, 即 1-甲基-2-(3-吡啶基)吡咯烷, 是烟草中的一种主要生物碱, 也是致人吸烟上瘾的关键性因素。研究表明, 尼古丁可导致 E coli 343/113 PolA⁺ 和 E coli 1787 PoiA⁻ 的 DNA 损伤^[1]; 抑制白细胞的生长和合成^[2]; 导致小鼠染色体异常^[3]。有证据表明尼古丁和其它致癌物在引起癌变过程中起协同作用^[4-6]。血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质, 它能结合、运输许多内源性和外源性化合物^[7]。在已有烟瘾人体血液中, 尼古丁浓度达到 10~15 ng·mL⁻¹^[8]。研究尼古丁与血清白蛋白相互作用有助于了解尼古丁的生理效应, 而相关的研究很少见报道^[9]。本文用荧光光谱研究了尼古丁在不同 pH 环境下对 BSA 的荧光猝灭机理及结合常数, 表明因不同 pH 环境下尼古丁和 BSA 形态不同导致荧光猝灭机理各异及结合常数随温度变化的敏感性不同; 紫外-可见光谱研究发现尼古丁与 BSA 作用可引起 BSA 二级结构的变化; 同步荧光光谱及紫外二阶导数光谱研究结果表明: 高浓度的尼古丁使 BSA 芳香性氨基酸(Trp, Tyr 和 Phe)残基微环境由疏水环境转变为亲水环境。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Cary 100 型紫外-可见分光光度计(美国, Varian 公司); RF-5301PC 荧光分光光度计(日本 SHIMADZU 公司); Sartorius PP-20 型多功能测量仪(德国)。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成浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; L-尼古丁(纯度高于 99%)购自美国 ACROS ORGANICS 公司, 用缓冲溶液配成浓度为 $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 避光保存; 其他试剂均为分析纯。不同 pH 的缓冲溶液用 KH₂PO₄, Na₂HPO₄, HCl, NaOH 调配, 并在 Sartorius PP-20 型多功能测量仪上精密测定。所有工作溶液保持 NaCl 浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并用二次去离子水新鲜配制。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光光谱及同步荧光光谱测定

取 10 支 10 mL 刻度试管, 固定 BSA 浓度为 5.0×10^{-6}

收稿日期: 2004-05-16, 修订日期: 2004-08-26

基金项目: 国家自然科学基金(20261001), 教育部“高校青年教师奖”基金和广西自然科学基金资助项目

作者简介: 陈 韵, 1965 年生, 广西师范大学化学化工学院在读硕士研究生 * 通讯联系人

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使尼古丁浓度分别为 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 45.0, 60.0 ($\times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 静置 4 h。在不同温度和 pH 条件下, 以 285 nm 为激发波长, 测 BSA 荧光光谱; 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-可见分光光谱及紫外二阶导数光谱测定

取 10 mL 刻度试管若干, 固定 BSA 浓度为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与不同量的尼古丁作用, 静置 4 h。(1) 尼古丁与 BSA 浓度比依次为 0, 0.6, 1, 5, 50, 100, 200, 400, 600, 800。扫描紫外-可见光谱; (2) 尼古丁与 BSA 浓度比依次为 0, 200, 600, 2 000。在紫外-可见分光光度计上作紫外-可见光谱进而得相应的紫外二阶导数光谱。

2 结果和讨论

2.1 荧光光谱及荧光猝灭机理

按实验方法 1.2.1, 保持溶液 pH 7.4, 温度 $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 测定其荧光光谱变化如图 1。

图 1 表明, 随着尼古丁浓度的增加, 在 345 nm 附近 BSA 最大发射峰强度逐渐降低并蓝移。说明尼古丁和 BSA 发生了作用。

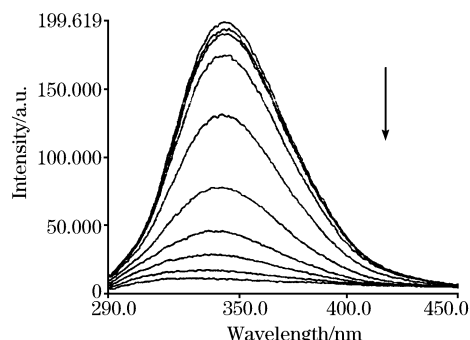


Fig. 1 Fluorescence spectra of BSA ($5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in buffer solution (pH 7.4) of different nicotine concentrations. ($t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.43, $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$), slit width: $E_x 5.0 \text{ nm}$, $E_m 5.0 \text{ nm}$, Sensitivity: Low)

Nicotine concentration from top to bottom: 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 45.0, 60.0 ($\times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

当荧光体与猝灭剂由于热运动发生碰撞时, 可引起荧光

体的荧光动态猝灭。这种动态猝灭服从 Stern-Volmer 方程^[10]

$$F_0/F = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_{sv} \cdot [Q] \quad (1)$$

式中 F_0 为猝灭剂(尼古丁)不存在时荧光体(BSA)的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; K_q 为双分子碰撞猝灭常数; $[Q]$ 为猝灭剂浓度; τ_0 为猝灭剂不存在时荧光体寿命; K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, 且有

$$K_{sv} = K_q \cdot \tau_0 \quad (2)$$

当荧光体与猝灭剂间形成不发荧光的复合体时, 服从如下静态猝灭关系式

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

式中 K_s 为荧光体同猝灭剂的结合常数, 且有

$$K_D = K_s^{-1} \quad (4)$$

K_D 为解离常数。由(1), (3)两式可知, 若为纯动态或静态猝灭时, F_0/F 对 $[Q]$ 作图可绘出一条斜率为 K_{sv} 或 K_s 的直线。

按实验方法 1.2.1, 用缓冲溶液控制溶液 pH 分别为 5.0, 7.4, 11.0, 温度为 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下在荧光仪上扫描不同浓度尼古丁与 BSA 作用荧光光谱(图略)。其相对荧光强度与一定范围尼古丁浓度有良好的线性关系(见图 2)。根据式(1)可求得 K_{sv} (即 Stern-Volmer 方程的斜率)。由于生物大分子的荧光寿命约为 10 ns 数量级^[11], 可由(2)式分别求得表观猝灭常数 K_q 。各相关数据列于表 1。

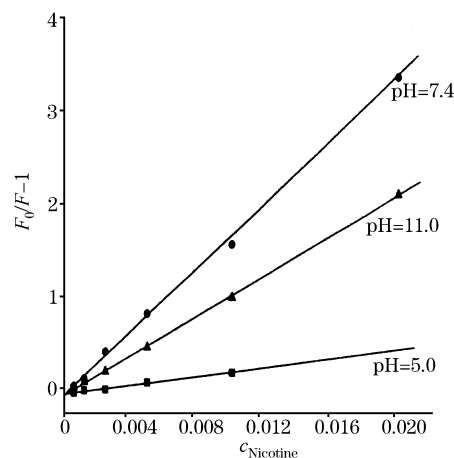


Fig. 2 Relationship between concentrations of nicotine and relative intensity of BSA fluorescence in different pH buffer solutions

c: concentration

Table 1 Relationship between concentrations of nicotine and relative intensity of BSA fluorescence in different pH buffer solutions

pH	Linear range($\times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Stern-Volmer equation	Linear relative coefficient	$K_q[(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$
5.0($20 \text{ }^\circ\text{C}$)	0.625~10	$F_0/F-1=22.944[Q]-0.0386$	$r=0.9970$	0.22944×10^{10}
7.4($20 \text{ }^\circ\text{C}$)	0.625~20	$F_0/F-1=182.69[Q]-0.2322$	$r=0.9950$	1.8269×10^{10}
7.4($37 \text{ }^\circ\text{C}$)	0.625~20	$F_0/F-1=169.15[Q]-0.1546$	$r=0.9971$	1.6915×10^{10}
11.0($20 \text{ }^\circ\text{C}$)	0.625~20	$F_0/F-1=106.47[Q]-0.0549$	$r=0.9997$	1.0647×10^{10}
11.0($37 \text{ }^\circ\text{C}$)	0.625~20	$F_0/F-1=60.99[Q]-0.0264$	$r=0.9992$	0.6099×10^{10}

表 1 显示, 在温度为 20 °C, pH 为 5.0 的体系其 K_q 远远小于猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 2.0×10^{10} ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [12], 说明在此条件下尼古丁对 BSA 的荧光猝灭为动态猝灭; 而 pH 为 7.4 和 11.0 体系的 K_q 和猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数几乎处在同一数量级。进一步对 pH 7.4 和 11.0 体系相同试样在温度为 37 °C 做相同实验, 所得数据也列于表 1。不同温度下所作相对荧光强度和尼古丁浓度关系图分别见图 3 和图 4。从表 1 可知, 温

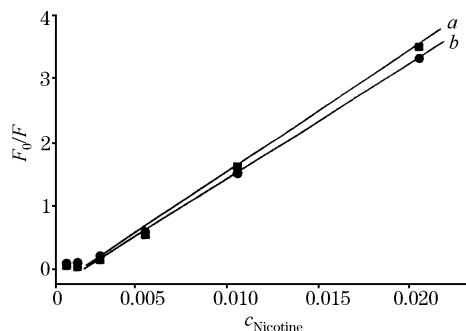
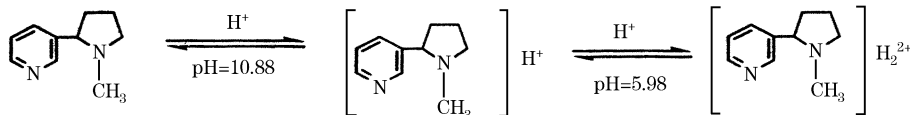


Fig. 3 Relationship between concentrations of nicotine and relative intensity of BSA fluorescence at the temperatures of 20 °C (a) and 37 °C (b) ($\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$) (pH 7.4)



当 $\text{pH} < 5$ 时, 主要以 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{H}_2^{2+}$ 形式存在, pH 在 5~8 时, 主要以 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{H}^+$ 形式存在, $\text{pH} > 10$ 时, 主要以尼古丁分子 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$ 形式存在[14]。pH 5 时 BSA 处于其等电点附近, 蛋白质分子结构相对紧密, 对荧光起主要贡献的芳香性氨基酸残基更多地处于疏水区中, 而尼古丁在此 pH 条件下主要以 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{H}_2^{2+}$ 形式存在, 带强正电荷的尼古丁相当于分子离子, 在一定程度上影响了它进入疏水区, 因此与处在疏水区中的芳香性氨基酸残基的作用机会减少。pH 7.4 时一方面 BSA 有更多的芳香性氨基酸残基暴露于 BSA 表面, 另一方面尼古丁所带正电荷减少而便于进入疏水区, 使得静态猝灭因素增大。pH 11.0 环境一方面 BSA 肽链充分伸展, 将更多疏水性氨基酸残基暴露于溶剂中[15], 同时尼古丁完全以分子形态存在, 可以在亲水区和疏水区中自由游动, 因而与尼古丁作用机会增大, 静态猝灭因素大为增加。

2.2 BSA 和尼古丁的结合常数

有机物小分子对蛋白质荧光猝灭是静态猝灭时, 其结合常数可用式(5)求得[16]。式中 F_0 为未加尼古丁时 BSA 的荧光强度, F 为加入尼古丁后 BSA 的荧光强度, $[Q]$ 为尼古丁的浓度, k 为结合常数

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + k^{-1}F_0^{-1}[Q]^{-1} \quad (5)$$

按实验方法 1.2.1, 用缓冲溶液控制溶液 pH 分别为 7.4, 11.0, 温度为 20 和 37 °C 条件下在荧光仪上扫描不同浓度尼古丁与 BSA 作用荧光光谱(图略)。根据所得荧光实验数据, 由式(5)作出 BSA 荧光强度与尼古丁浓度的双倒数图, 即以

度的升高使 pH 7.4 体系和 pH 11.0 体系的 K_q 都有不同程度的下降, 说明升高温度不利于此二体系的荧光猝灭, 此二体系为静态猝灭[13]。

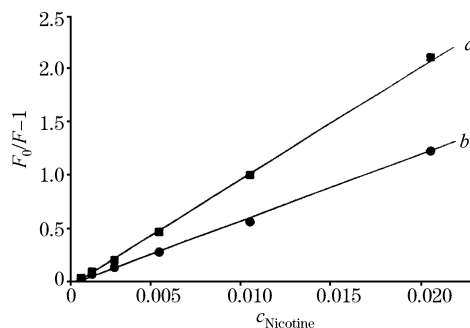


Fig. 4 Relationship between concentrations of nicotine and relative intensity of BSA fluorescence at the temperatures of 20 °C (a) and 37 °C (b) ($\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$) (pH 11.0)

造成不同 pH 时猝灭机理相异的原因, 可以从不同 pH 环境中尼古丁和 BSA 的不同形态加以解释。尼古丁是一种有机二元弱碱 ($\text{p}K_{b1} = 5.98$, $\text{p}K_{b2} = 10.88$), 在水溶液中存在 3 种形式 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{H}^+$ 和 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{H}_2^{2+}$) 的平衡关系:

($F_0 - F$) $^{-1}$ 对 $[\text{Nicotine}]^{-1}$ 作图 5, 由直线斜率和 F_0 求得不同温度和 pH 下 BSA 和尼古丁的结合常数(见表 2)。

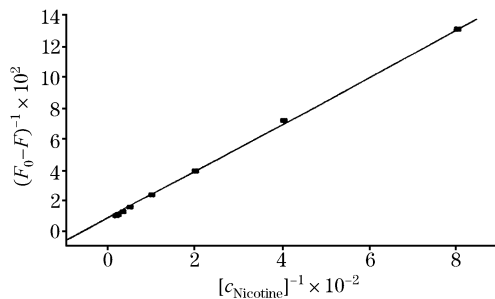
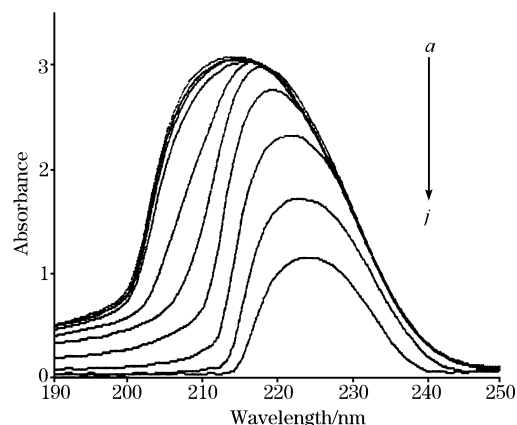


Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of nicotine and BSA (pH 7.4, $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$)

表 2 显示, 温度为 20 °C 时, pH 7.4 和 pH 11.0 体系的结合常数非常接近。所不同的是温度升高对 pH 7.4 体系结合常数的影响远比对 pH 11.0 体系的结合常数的影响小。一种可能是 pH 7.4 体系中尼古丁结合一个 H^+ , 此 H^+ 易与 BSA 中肽链中电负性较强的 O 和 N 之间形成氢键, 使尼古丁与 BSA 的结合更加牢固, 而 pH 11.0 体系中, 尼古丁不带 H^+ , 不易与 BSA 中肽链中电负性较强的 O 和 N 之间形成氢键, 因而其结合常数受温度升高的影响比存在氢键的 pH 7.4 体系要大得多。

Table 2 Association constants of nicotine and BSA at different pH and temperatures

pH	Linear range($\times 10^{-3}$ mol \cdot L $^{-1}$)	Lineweaver-Burk Equation	Linear relative coefficient	$k/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
7.4(20 $^{\circ}\text{C}$)	5~60	$y=3.61 \times 10^{-5}x+0.004714$	0.9995	140.15
7.4(37 $^{\circ}\text{C}$)	5~60	$y=4.75 \times 10^{-5}x+0.0057764$	0.9997	131.83
11.0(20 $^{\circ}\text{C}$)	1.25~80	$y=5.92 \times 10^{-5}x+0.00308$	0.9994	141.76
11.0(37 $^{\circ}\text{C}$)	1.25~80	$y=1.543 \times 10^{-4}x+0.007472$	0.9987	27.79

**Fig. 6** UV spectra of 5×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$ BSA in buffer solution (pH 7.4) of different ratios of $[c_{\text{nicotine}}]/[c_{\text{BSA}}]$: 0, 0.6, 1, 5, 50, 100, 200, 400, 600, 800 (from a to j)

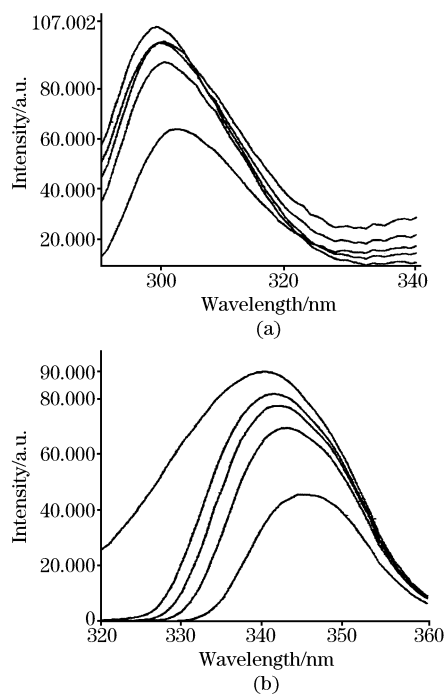
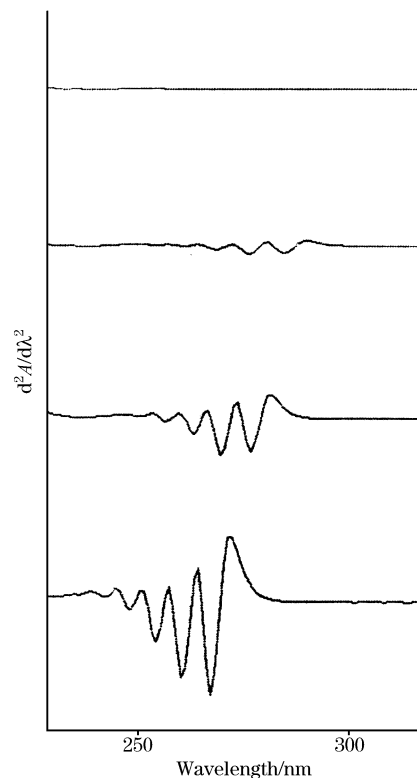
2.3 尼古丁结合诱导 BSA 构象变化和对芳香性氨基酸残基微环境的影响

2.3.1 BSA 二级结构的变化

按方法 1.2.2(1), 保持 pH 7.4, 温度 20 $^{\circ}\text{C}$, 测定不同浓度尼古丁时 BSA 的紫外-可见光谱见图 6。由于尼古丁在 210 nm 附近有吸收, 因而在测定 BSA 在 210 nm 吸光度变化时, 每次都应以相同浓度的尼古丁作空白对比。从图 6 可见, 随着尼古丁浓度的增加, BSA 在 210 nm 附近的吸光强度逐渐降低, 并且峰位发生红移, 说明尼古丁和 BSA 彼此间发生了相互作用。蛋白质在 210 nm 左右的峰主要反映 BSA 二级螺旋结构^[17] 状况, 在 210 nm 处吸光度下降, 说明 BSA 主链构象发生变化, 即螺旋结构变松散^[18]。

2.3.2 BSA 芳香性氨基酸残基微环境的变化

按实验方法 1.2.1, 使激发波长保持固定的波长间隔 ($\Delta\lambda$), 同步扫描激发和发射单色器, 可得到同步荧光光谱。

**Fig. 7** Synchronous fluorescence spectra of BSA in different nicotine concentrations: 0, 2.5, 5, 10, 30 ($\times 10^{-3}$ mol \cdot L $^{-1}$) from top to bottom. (a) $\Delta\lambda=15$ nm, (b) $\Delta\lambda=60$ nm ($t=20$ $^{\circ}\text{C}$, Slit width: $E_x=E_m=5$ nm)**Fig. 8** Effect of $c_{\text{nicotine}}/c_{\text{BSA}}$ ratios (0, 200, 600, 2000, from top to bottom) on the UV/Vis second derivative spectra with 5×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$ BSA at (20 $^{\circ}\text{C}$)

同步荧光光谱已被用于探测蛋白质中 Trp 和 Trp 微环境的改变^[19]。由 $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 15 \text{ nm}$ 所作同步荧光光谱只显示 Tyr 残基的光谱特征, 而 $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 60 \text{ nm}$ 同步荧光光谱仅显示 Trp 残基的光谱特征^[20]。因芳香氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境之极性有关, 故由发射波长的改变可判断 BSA 芳香氨基酸残基所处微环境的变化。图 7(a)和(b)分别是 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, pH 7.4 温度为 20 °C 时 BSA 随尼古丁浓度变化的同步荧光光谱。图中显示, 在 BSA 浓度固定为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随尼古丁浓度的增加, 图 7(a)和(b)中最大发射波长都有逐渐红移和强度降低。所不同的是, 在尼古丁浓度在 $2.5 \sim 30 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 变化过程中, (b)中红移现象更为明显(约 8 nm), 而(a)中红移幅度较小(约 4 nm), 说明高浓度尼古丁可同时影响 Trp 残基和 Tyr 残基所处微环境。BSA 荧光发射峰位的红移, 说明 Trp 残基和 Tyr 残基所处微环境的亲水性增加; 荧光强度的降低说明高浓度尼古丁使蛋白质分子伸展, 降低了芳香氨基

酸残基间的能量传递, 使两者荧光强度降低^[15]。

利用二阶导数光谱可以观测常规紫外光谱难以观测的 Phe 残基微环境的变化^[21]。图 8 为按实验方法 1.2.2(2)在 BSA 浓度为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 尼古丁与 BSA 浓度比分别为 0, 200, 600, 2 000, pH 为 7.4, 温度为 20 °C 时的紫外二阶导数光谱。由图可见, 随尼古丁浓度的增加, 在 250~260 nm 处 Phe 残基的特征吸收峰出现, 并随尼古丁浓度的增加略有蓝移, 说明苯丙氨酸残基所处的微环境发生了变化。产生这种变化的原因, 一是由于尼古丁的加入使酪氨酸残基的吸收峰红移, 使 Phe 残基原本被掩盖的特征吸收峰重新露出^[16]; 二是尼古丁所带的正电荷使 Phe 残基微环境的极性增强, Phe 残基间的疏水相互作用减弱。结合色氨酸和酪氨酸残基微环境的改变和 BSA 紫外-可见光谱随尼古丁浓度增加的变化说明, 高浓度的尼古丁使蛋白链更为伸展。

本文的研究成果未见有文献报道, 很有实际意义, 类似的工作亦可参阅文献^[22]。

参 考 文 献

- [1] Florin I, Rut berg L, Gurvall M, et al. Toxicology, 1980, 18: 219.
- [2] Konno S, Chiao J W. Cancer Lett., 1986, 33: 91.
- [3] Bishun N P, Liod N, Raven R W. Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 1972, 23: 175.
- [4] Bock F G. Report(CSH), 1980, 3: 129.
- [5] Hoffmann D, Lovdie E J, Hecht S S. Cancer Lett., 1985, 26: 67.
- [6] Benowitz I. Ann. Rev. Med., 1986, 37: 21.
- [7] Ulrich K H. Pharmacol. Rev., 1981, 33(1): 17.
- [8] Jin W B, Yang G P. Chemistry of Nicotine, Beijing: Chinese Light Industry Press, 1993. 23.
- [9] WANG Hai-fang, WANG Yan, CHENG Yan, et al. Chinese Science Bulletin., 2002, 47(7): 538.
- [10] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑株梓, 等). Fluorescence Analysis Method(Edition II) (荧光分析法, 第 2 版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [11] Lakowicz J R, Weber G. Biochemistry, 1973, 12: 4161.
- [12] Ware W. J. Phys. Chem., 1962, 66: 455.
- [13] MA Gui-bin, YANG Pin(马贵斌, 杨 频). Chemistry in Life(生命的化学), 1992, 12(2): 28.
- [14] LI De-liang, ZHAO Jin(李德亮, 赵 瑾). Chemistry Bulletin(化学通报), 2002, (3): 174.
- [15] WEI Xiao-fang, DING Xi-ming, LIU Hui-zhou(魏晓芳, 丁西明, 刘会洲). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(4): 556.
- [16] MA Gui-bin, YANG Pin(马贵斌, 杨 频). Chinese Biochemical Journal(生物化学杂志), 1992, 8(5): 624.
- [17] GUO Yao-jun(郭尧君). Technology of Spectrophotometry and Its Application in Biochemistry(分光光度技术及其在生物化学中的应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1987. 230.
- [18] WANG Ya-li, WANG Hai-fang(王亚俐, 王海芳). Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinesis(北京大学学报, 自然科学版), 2002, 38(2): 159.
- [19] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Photochem. Photobio., 1973, 18: 263.
- [20] YANG Pin, YANG Man-man. Chin. J. Chem., 1996, 14(2): 109.
- [21] LIANG Hong, ZHOU Yong-qia, SHENG Pan-wen(梁 宏, 周永洽, 申洋文). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1996, 16(5): 116.
- [22] XIAO Hou-rong, SHENG Liang-quan, SHI Chun-hua, et al(肖厚荣, 盛良全, 施春华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 78.

Spectroscopic Studies on the Interaction of Nicotine and BSA

CHEN Yun, KONG Xiang-rong, SHEN Xing-can, LIANG Hong*

Institute of Bioinorganic Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Abstract The interaction of nicotine and bovine serum albumin(BSA) was investigated by fluorescence spectra and UV-vis spectra. The fluorescence spectrum showed that BSA fluorescence quench regularly with the addition of nicotine. The fluorescence quenching mechanisms were also studied in pH 5.0, pH 7.4 and pH 11.0 by Stern-Volmer equation, indicating dynamic quenching(pH 5.0) and static quenching(pH 7.4 and pH 11.0) respectively. Association constants (k) of nicotine and BSA at pH 7.4 and pH 11.0 at the temperatures of 20 and 37 °C were given by the Lineweaver-Buck equation, which are: $k_{20\text{ }^\circ\text{C}} = 140.15 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $k_{37\text{ }^\circ\text{C}} = 131.83 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7.4), and $k_{20\text{ }^\circ\text{C}} = 141.76 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $k_{37\text{ }^\circ\text{C}} = 27.79 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 11.0), suggesting that the association constant is effected by the temperature much more remarkably at pH 7.4 than that at pH 11.0 because of the different states of nicotine at different pHs. The UV-Vis spectra exhibit that the absorbance of BSA(210 nm) shifts to red and decreases gradually with the addition of nicotine, reflecting the transition of secondary structure of BSA, namely, the helix of BSA becomes looser. The UV-Vis second derivative spectra and synchronous spectra ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 15 \text{ nm}$ and $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 60 \text{ nm}$) imply the change of the microcircumstance of aromatic amino residues of BSA(Trp, Tyr and Phe) from hydrophobicity to hydrophilicity at high concentration of nicotine.

Keywords Nicotine; Serum albumin; Spectroscopic studies

(Received May. 16, 2004; accepted Aug. 26, 2004)

* Corresponding author