

## 维生素 B<sub>6</sub> 与人血清白蛋白的相互作用

王建林<sup>2</sup>, 付连春<sup>3</sup>, 周实武<sup>4</sup>, 陈志坚<sup>1</sup>, 吕文波<sup>1</sup>, 叶学敏<sup>1</sup>, 孟广政<sup>5</sup>, 宋增福<sup>1\*</sup>

1. 北京大学物理学院, 北京 100871
2. 郑州轻工业学院, 材料与化学工程学院, 河南 郑州 450002
3. 中国纺织科学研究院北京中纺化工有限公司, 北京 100025
4. 扬州大学物理科学与技术学院, 江苏 扬州 225002
5. 钢铁研究总院, 北京 100081

**摘要** 人血清白蛋白(HSA)在296 nm的光激发下能发射350 nm的荧光(即 $\lambda_{\text{ex}}=296$ ,  $\lambda_{\text{em}}=350$  nm)。当HSA中加入适量的维生素B<sub>6</sub>(B<sub>6</sub>)后, HSA的荧光被部分猝灭, 从 $\tau_0$ (不加B<sub>6</sub>时HSA的荧光寿命——分子激发态的寿命)与 $\tau_i$ (加入B<sub>6</sub>后的寿命)相等(近似)得知这种猝灭是静态猝灭。根据理论, 可求出HSA与B<sub>6</sub>间的结合常数 $K=2.67 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。又从实验上可观察到HSA(它的激发态)可向B<sub>6</sub>转移能量, 由此可求出HSA和B<sub>6</sub>间的临界距离 $R_0=1.872$  nm。测定了HSA和(HSA+B<sub>6</sub>)的圆二色(CD)谱, 发现所测得的CD谱都很相似(基本上是一样的)。从测得的 $[\theta]$ 值可以算出各个样品所含的四种结构( $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠片、 $\beta$ -卷角, 无规卷曲)的百分含量也大体相同。

**主题词** HSA; B<sub>6</sub>; 荧光寿命; 圆二色谱

**中图分类号**: O644

**文献标识码**: A

**文章编号**: 1000-0593(2005)06-0912-04

### 引言

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是血浆中最丰富的蛋白质, 在人体内起着重要的贮存和输运作用, 它是由20种L-氨基酸(实际上是19种氨基酸和1种亚氨基酸)合成的多聚体。从它的结构来看, 包含有: $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helix)、 $\beta$ -折叠片( $\beta$ -pleated sheet)、 $\beta$ -卷角( $\beta$ -corner)和无规卷曲(randon wind)<sup>[1, 2]</sup>。

HSA能发射荧光, 其发射峰约在350 nm。把药物或金属离子加入到HSA中, 能猝灭它的荧光, 从而能求得荧光体(HSA)与猝灭体(外加药物或金属离子)间形成复合物的表观结合常数 $K$ 。进一步, 还能求得荧光体与猝灭体间的临界距离 $R_0$ <sup>[3-10]</sup>。作者测定了B<sub>6</sub>(维生素B<sub>6</sub>)与HSA的 $K$ 值和 $R_0$ 值。

氨基酸分子中有不对称的碳原子, 显示出光学活性, 所以在光学上, HSA有旋光性, 另外, HSA在200~240 nm波段间有强吸收, 表现出吸收的各向异性, 显示了它的圆二色性(circular dichroism, CD), 一般用椭圆值 $[\theta]$ 表示圆二色性。测得 $[\theta]$ 值后, 可以算出HSA的结构(构象)。我们的工作中, 在HSA中加入了不同含量的B<sub>6</sub>, 发现它的结构并不

随B<sub>6</sub>加入量的不同而有大的变化(或者说变化很小)。总之, 我们进行这两个方面的工作, 得到一些有意义的结果, 并有一定的参考价值。

### 1 HSA的荧光

HSA能发射较强的荧光, 在室温下, 激发波长( $\lambda_{\text{ex}}$ )为296 nm, 发射峰( $\lambda_{\text{em}}$ )约350 nm, 在低温(本实验在153 K下进行的)下荧光稍有增强。当在HSA中加入适量的B<sub>6</sub>后, 则HSA的荧光强度有所减弱, 也就是荧光被猝灭。猝灭的程度随B<sub>6</sub>的浓度(记为 $[B_6]$ )增加而加强。B<sub>6</sub>本身也有荧光发射, 它的 $\lambda_{\text{ex}}=325 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=408$  nm。例如用He-Ne激光632.8 nm的倍频紫外激光316 nm激发B<sub>6</sub>, 可以观察到它的荧光, 在B<sub>6</sub>中加入适量的HSA, 则B<sub>6</sub>的荧光增强<sup>[4]</sup>, 这说明HSA与B<sub>6</sub>间存在能量转移, 从这里也可以看出, B<sub>6</sub>与HSA间有相互作用。通常相互作用有两种, 即静态猝灭和动态猝灭。动态猝灭是猝灭剂(B<sub>6</sub>)与荧光物质(HSA)的激发态分子间发生相互作用的过程, 也就是能生成瞬时的激发复合态(不发射荧光), 因此使荧光物质的荧光减弱, 亦使其激发态分子的寿命 $\tau$ 变小(小于 $\tau_0$ ,  $\tau_0$ 为未加猝灭时的寿命)。静态猝灭是猝灭剂和荧光物质的分子在基态时发生配合反应,

收稿日期: 2004-12-08, 修订日期: 2005-02-28

基金项目: 国家自然科学基金(专项基金: 10244001)资助项目

作者简介: 郑州轻工业学院材料与化学工程学院讲师 \* 通讯联系人

所生成的配合物通常是不发光,这就使荧光物质的荧光被猝灭(荧光强度减弱),而其激发态分子寿命 $\tau$ 不变(一般 $\tau$ 等于 $\tau_0$ )。

### 1.1 动态猝灭

以 $F_0$ 表示未加猝灭剂时的荧光物质的荧光强度, $F$ 为加入一定量猝灭剂时的荧光强度,则有

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[B_6], \quad \frac{F_0}{F} - 1 = K_{sv}[B_6] \quad (1)$$

(1)式称为 Stern-Volmer 方程式,式中的 $[B_6]$ 为 $B_6$ 的浓度( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。以 $\frac{F_0}{F} - 1$ 对 $[B_6]$ 作图,得一直线,从其斜率即可求得 $K_{sv}$ ( $K_{sv}$ 为猝灭常数, $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )。

### 1.2 静态猝灭

与上述相似,以下列公式表示静态猝灭

$$\frac{F_0}{F} - 1 = K[B_6] \quad (2)$$

(2)式中的 $K$ 是为结合常数( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )。

从(1)式和(2)式可以看出,二种情况下的表达式完全一样,只是 $K_{sv}$ 和 $K$ 的含义有所区别<sup>[1,9]</sup>。

### 1.3 K 值的测定

作者测定了 HSA 荧光的 $\tau_0$ 值(不加 $B_6$ , $[HSA]$ : $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),又测定了加入不同含量 $B_6$ 的 $\tau_i$ 值( $\tau_1$  ( $[B_6]$ : $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\tau_2$  ( $1.5 \times 10^{-5}$ ), $\tau_3$  ( $2.5 \times 10^{-5}$ )),它们分别为 1.77, 2.02, 1.86, 1.87 ns。从这里可以看出,这 4 个 $\tau$ 值近似相等,因此可以认为在这种情况下的猝灭为静态猝灭。我们进一步测量了 $F_0$ (HSA 的荧光相对值,不加 $B_6$ )和 $F$ (加 $B_6$ 时 HSA 的荧光相对值),从而得到 $(\frac{F_0}{F} - 1)$ 值,结果列于表 1。根据表 1,作出图 1,根据图 1 的直线斜率,得到结合常数 $K = 2.67 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

Table 1 The  $[B_6]$  and  $(\frac{F_0}{F} - 1)$  values

Samples	$F$	$(\frac{F_0}{F} - 1)$	$B_6/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	$2.52(F_0)$	0	
2	2.41	0.046	0.357
3	2.18	0.160	0.684
4	1.58	0.594	2.730
5	1.49	0.690	3.170

### 1.4 无辐射能量转移

在 HSA(能量给体)中加入 $B_6$ (能量受体)后,处于激发态的 HSA 可把能量转移给 $B_6$ ,称之为 Föster 偶极-偶极无辐射能量转移,从下式可求得临界距离 $R_0$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K_1^2 \phi_D n^{-4} \cdot J \quad (3)$$

式中 $K_1^2$ 的为取向因子( $K_1^2 = 2/3$ ); $\phi_D$ 为无猝灭剂( $B_6$ )时荧光物质(HSA)的量子产率( $\phi_D = 0.11$ ); $n$ 为介质的折射率( $n = 1.36$ ); $J$ 为重叠积分。为了求 $J$ 值,测量了 HSA 的荧光谱和 $B_6$ 的吸收谱,见图 2。从图 2 看出,二者有重叠部分,根据下式可求出重叠积分<sup>[4]</sup>

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda)d\lambda} \quad (4)$$

(4)中的 $\epsilon(\lambda)$ 为 $B_6$ 的摩尔吸光系数,根据文献[4]的方法,由重叠部分可求出 $J$ 值, $J = 2.282 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,从而可求得 $R_0 = 1.872 \text{ nm}$ 。

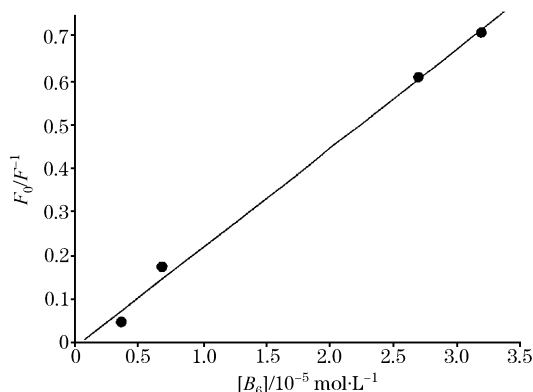


Fig. 1 Scheme of  $[B_6]$  vs  $[(F_0/F) - 1]$

$[HSA]: 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

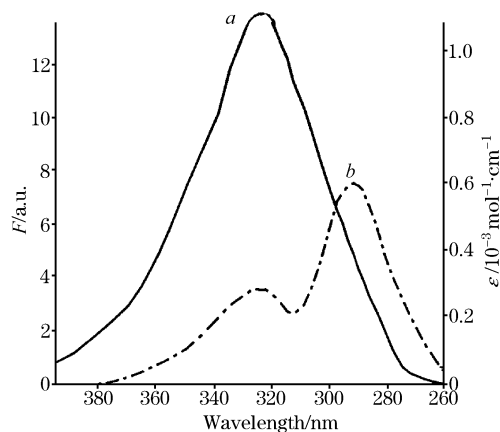


Fig. 2 Fluorescence spectrum of HSA (a) and absorption spectrum of  $B_6$  (b) ( $[HSA] = [B_6] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

## 2 圆二色(CD)谱

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 $B_6$ 后,观察其结构的变化,一般,CD 谱用椭圆值 $[\theta]$ 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“ $^\circ$ ” $\cdot \text{cm}^2 \cdot (\text{dm} \cdot \text{mol})^{-1}$ , $A_L$ 和 $A_R$ 分别为物质对入射的左旋和右旋偏振光的吸收率,“ $^\circ$ ”表示度(degree)。从 CD 谱可得到样品构象的 $[\theta]$ 值,例如文献[1]给出了多聚 L-赖氨酸(PLL)的 $[\theta]$ 值,见图 3 所示。

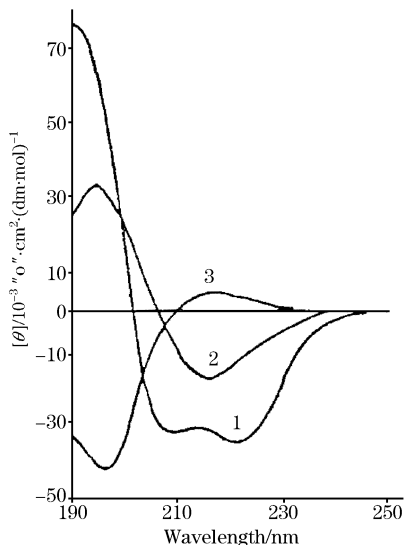


Fig. 3 Three conformation CD spectra of Polymer L-Lysine

1, 100%  $\alpha$ -Helix; 2, 100%  $\beta$ -Pleated sheet;  
3, 100% Random wind

本文测定了 HSA 和 HSA 中加入一定量  $B_6$  的 CD 谱, 所有 CD 谱的图形很相似(基本上相同)。 $[\theta]$  的峰值(负峰)在 208~240 nm 范围内。总共测定了多个样品, 除不加  $B_6$  的样品外给出加  $B_6$  的样品 5 个列于表 2。图 4 是样品的 CD 谱(只给出一个, 因为图形都相似)。从  $[\theta]$  值可以计量出 HSA 四种结构的含量(实际上只有 3 种, 因为  $\beta$  转角的含量为零)。所得结果列于表 3。从表 3 可以看出, 在样品中 3 种结构的含量近似相等(稍有变化), 这与上述提到的 CD 谱一样。计算四种结构的理论和方法在文献[11-13]中有着详细的论述。本文测量 CD 谱所用仪器的型号为 JASO-700。该仪器内部有计算程序, 当测出  $[\theta]$  值(在一定波段范围内)后就可以算出结构( $\alpha$ -螺旋, ……等)的含量。

Table 2 Contents of  $B_6$  in Samples  
( $[HSA]=1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Samples	$[B_6]/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	$5 \times 10^{-8}$
2	$1.5 \times 10^{-7}$
3	$2.5 \times 10^{-7}$
4	$3.5 \times 10^{-7}$
5	$4.5 \times 10^{-7}$

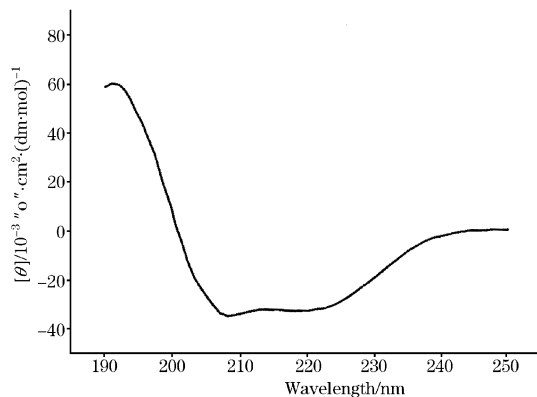


Fig. 4 CD spectrum of sample

Table 3 Construction contents in samples(%)

Samples	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Pleated sheet	$\beta$ -Corner	Random wind
1	38.6	35.6	0	25.8
2	39.5	33.6	0	26.9
3	35.7	36.8	0	27.5
4	37.0	35.7	0	27.4
5	39.3	31.3	0	29.4

综上所述, 本文讨论了在 HSA 中加入微量  $B_6$  后, 其构象基本不变(变化很小), 另外也讨论了  $B_6$  与 HSA 的作用是静态猝灭以及其间有能量转移。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] LI Yuan-zong, CHANG Wen-bao(李元宗, 常文保). Biochemistry Analysis(生化分析). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 2003.
- [ 2 ] Harr R Matthews, Richard A Freedland, Roger L Miesfeld, Editors, Translated by WU Xiang-yu(吴相钰译). Biochemistry—A Short Course(生物化学简明教程). Beijing: Peking University Press(北京: 北京大学出版社), 2001.
- [ 3 ] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, XU Jin-gou, WANG Zun-ben(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 许金钩, 王尊本). Fluorescence Analysis Method(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [ 4 ] MA Gui-bin, YANG Pin(马贵斌, 杨 频). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 1990, 17(4): 290.
- [ 5 ] YANG Bin-sheng, YANG Pin(杨斌盛, 杨 频). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 1992, 19(2): 110.
- [ 6 ] LIANG Hong, XING Ben-gang, WU Qin-xuan, LUO Ji-wen, ZHOU Yong-qia, SHEN Pan-wen(梁 宏, 邢本刚, 吴庆轩, 罗济文, 周永洽, 申洋文). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1999, 57: 161.
- [ 7 ] LIU Bao-sheng, ZHANG Hong-yi, WANG Fu-li(刘保生, 张红医, 王甫丽). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 539.
- [ 8 ] YU Tian-zhi, YANG Ru-dong(俞天智, 杨汝栋). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(4): 763.
- [ 9 ] JIANG Chong-qiu, GAO Ming-xia(江崇球, 高明霞). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 937.
- [ 10 ] ZHAO Chang-chun, ZHENG Wei-fa, LI Meng-qiu(赵长春, 郑维发, 李梦秋). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 111.
- [ 11 ] LU Zi-xian(鲁子贤), Application of Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion in Biology(圆二色性和旋光色散在分子生物学中的应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1987.
- [ 12 ] BIAN Wei-dong, WONG R N S, SUN Su-qin, ZHOU Qun(卞为东, 黄岳顺, 孙素琴, 周 群). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(4): 492.
- [ 13 ] LIU Hai-yang, YING Xiao, HU Xi-ming, LIU Yi, HUANG Jian, et al(刘海洋, 应 晓, 胡希明, 刘 义, 黄 剑, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(4): 495.

## The Interaction of Vitamin B<sub>6</sub> with the Human Serum Albumin

WANG Jian-lin<sup>2</sup>, FU Lian-chun<sup>3</sup>, ZHOU Shi-wu<sup>4</sup>, CHEN Zhi-jian<sup>1</sup>, LA Wen-bo<sup>1</sup>, YE Xue-min<sup>1</sup>, MENG Guang-zheng<sup>5</sup>, SONG Zeng-fu<sup>1\*</sup>

1. School of physics, Peking University, Beijing 100871, China

2. College of Material Science and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

3. CTA-Text Chemicals, Beijing 100025, China

4. College of Physical Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225002, China

5. Central Iron and Steel Research Institute, Beijing 100081, China

**Abstract** The Human Serum Albumin(HSA) can emit fluorescence( $\lambda_{em} = 350$  nm) under irradiation of ultraviolet light( $\lambda_{ex} = 296$  nm). After the vitamin B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) was added into HSA solution the fluorescence of HSA was quenched partially. This quenching was static quenching owing to the fact that  $\tau_0$  (fluorescence life time (life time of the molecule excitation state) of HSA without B<sub>6</sub>) equaled to  $\tau_1$  (fluorescence life time of HSA with B<sub>6</sub>). The formation constant  $K$  between HSA and B<sub>6</sub> was observed from the experiment, and then the binding distance  $R_0$  was determined ( $R_0 = 1.872$  nm). The CD spectra of samples (HSA, [HSA] =  $1 \times 10^{-5}$  mol · L<sup>-1</sup>, HSA + B<sub>6</sub>, [B<sub>6</sub>] =  $5 \times 10^{-8}$ ,  $1.5 \times 10^{-7}$ ,  $2.5 \times 10^{-7}$ ,  $3.5 \times 10^{-7}$ ,  $4.5 \times 10^{-7}$  mol · L<sup>-1</sup>) were measured, and all CD spectra were almost the same. From  $[\theta]$  values, the contents (percent content) of four structure ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Pleated,  $\beta$ -corner, and Randon wind) of samples can be calculated, and we find that all samples contain almost the same structure contents.

**Keywords** HSA; B<sub>6</sub>; Fluorescence life time; CD spectra

(Received Dec. 8, 2004; accepted Feb. 28, 2005)

\* Corresponding author