

with the expressed antigen and HCMV AD 169 antigen detected by using ^{125}I -labelled protein A. The results of Dot-blot and Western transfer show that the protein expressed from the cloned gene has the same band in size and specificity of antigen as those of the synthetic poly-peptide. By using horse radish peroxidase (HRP) labelled IgG instead of ^{125}I -protein A, preliminary result indicated the diagnostic value of the expressed protein and its antiserum for the HCMV infection.

Key words Human cytomegalovirus (HCMV), Glycoprotein, Expression plasmid, Polymerase chain reaction (PCR)

人血清白蛋白与金属离子作用的荧光光谱研究

杨斌盛 杨频

(山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

提 要

通过金属离子对人血清白蛋白内源荧光的猝灭, 探讨了金属离子 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} 等与人血清白蛋白的结合; 基于 Förster 无辐射能量转移机理, 得出了人血清白蛋白第一类 Cu^{2+} 结合部位与 214 位色氨酸残基间的距离。

关键词 荧光猝灭, 人血清白蛋白, 金属离子

约占人血浆蛋白 60% 的人血清白蛋白 (HSA) 在人体内起着重要的贮存和输运作用。它与许多内源、外源化合物结合。这些化合物可以是有机化合物, 如脂肪酸、溶血卵磷脂、胆红素、色氨酸、甲状腺素、药物、染料、甾族化合物等^[1], 也可以是无机离子, 如人血清白蛋白与 Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} 等离子的结合^[2-7]。关于人血清白蛋白与金属离子的结合研究, 其研究方法多采用示踪法、pH 滴定法、离子探针法^[8]等。本文通过观察金属离子对人血清白蛋白内源荧光的猝灭, 探讨了金属离子与人血清白蛋白的结合。

1 基本原理

荧光猝灭可由动态猝灭、静态猝灭效应及无辐射能量转移所引起。

当荧光体与猝灭体由于热运动等发生碰撞时, 可引起荧光体的荧光猝灭, 这种动态猝灭服从 Stern-Volmer 方程:

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

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, τ_0 为猝灭体不存在时荧光体的荧光寿命, K_D 为 Stern-Volmer 常数, 且有:

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

当荧光体与猝灭体间形成不发荧光的复合物时, 根据化学平衡关系可得静态猝灭所服从的关系如下:

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

K_s 为荧光体与猝灭体间的结合常数。由方程 (1) 和 (3) 可知, 若为纯的动态或静态猝灭时, F_0/F 对 $[Q]$ 作图将给出一条斜率为 K_D 或 K_s 的直线。

静态猝灭除荧光体与猝灭体间形成不发荧光的复合物外, 还可能有无辐射能量转移过程的出现, 反映在荧光光谱上的是荧光体的荧光被部分猝灭, 猝灭的程度取决于荧光体(能量给

予体)与猝灭体(能量接受体)间的距离,并有:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (4)$$

其中 E 为能量转移效率, R_0 为能量转移效率 50% 时荧光体与猝灭体间的临界距离, r 为荧光体与猝灭体间的真实距离。

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \phi J \quad (5)$$

这里 K^2 为取向因子, n 为介质的折射指数, ϕ 为猝灭体不存在时荧光体的量子产率, J 为光谱重叠积分, 且有:

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (6)$$

$F(\lambda)$ 为荧光体在波长 λ 处的荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 为猝灭体在波长 λ 处的摩尔消光系数。

2 材料和方法

2.1 材料:

人血清白蛋白, 上海生物制品研究所; L-组氨酸, 中国科学院上海生物化学研究所; Tris, 上海化学试剂站分装厂; $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 : 分析纯, 北京红星化工厂; Eu_2O_3 : 99.9%, 湖南稀土制品研究所; 其它试剂均为分析纯。

荧光光谱仪: 日本岛津 Model-850 荧光光谱仪; 微升进样器: 中国科学院生物物理所产 5 μl 进样器。

2.2 实验方法:

配制浓度约为 10^{-4}mol/L 的人血清白蛋白溶液, 其配制方法见文献[6]。为了保持恒定的离子强度和酸度, 溶液中使用 0.15mol/L 的 NaCl 保持离子强度, 用 0.05mol/L 的 Tris-HCl 保持 $\text{pH} = 7.4$ 。

荧光光谱的测定在日本产岛津 Model-850 荧光光谱仪上进行, 使用 1cm 荧光池, 296nm 处激发, 逐渐滴加各种金属离子, 观察各种金属离子对人血清白蛋白荧光的猝灭。测定中扣除了 Tris-HCl 缓冲液本底荧光。

3 结果与讨论

在室温下, $\text{pH} = 7.4$, 离子强度为 0.15mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 人血清白蛋白在 296nm 处有最大激发峰, 在 350nm 处有最大荧光峰。该发光特征是由于人血清白蛋白 214 位色氨酸残基的发光所致。当向该溶液中滴加金属离子时, 观察不到激发、发射最大峰峰位的明显移动, 但发射峰强度明显地减弱, 其中 Cu^{2+} 的猝灭效应最为显著。按照(1)式, 将 F_0/F 对所加入的金属离子总浓度作图得出各种金属离子对人血清白蛋白荧光的猝灭曲线。图 1 是 Cu^{2+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭, 图 2 是 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Ca^{2+} 离子分别对人血清白蛋白荧光的猝灭。由图 1 可以看出, Cu^{2+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭在 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{HSA}]$ 近似为 1 处出现明显的折点。由图 2 可以看出, Ca^{2+} 对人血清白蛋白的荧光没有猝灭效应。

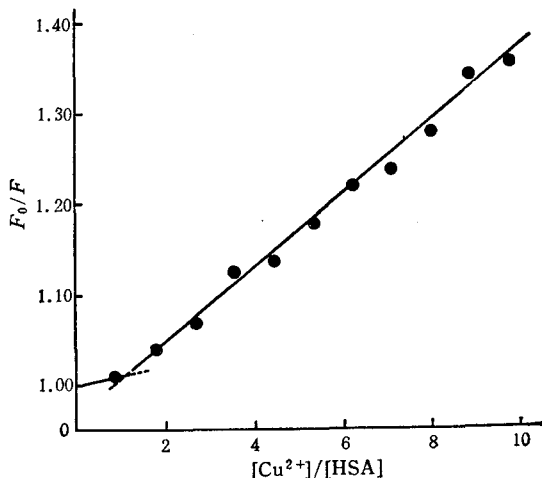


图 1 Cu^{2+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭

Fig. 1 Quenching effect of Cu^{2+} on the fluorescence of HSA at 350nm

$[\text{HSA}] = 10.34 \times 10^{-4}\text{mol/L}$

当向 $[\text{HSA}]:[\text{Cu}^{2+}] = 1:1$ 的溶液中逐渐滴加 L-组氨酸时, 可观察到人血清白蛋白 350nm 处的荧光峰逐渐增强。将 F_0/F 对所加入的 L-组氨酸总浓度作图, 结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, 当 L-组氨酸的浓度大于 2 倍

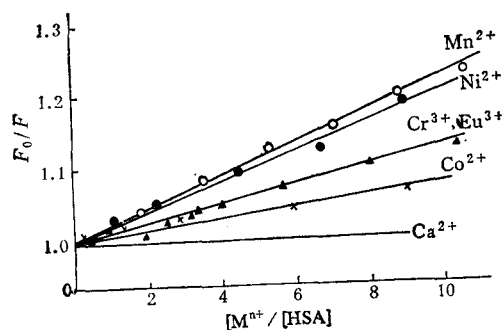
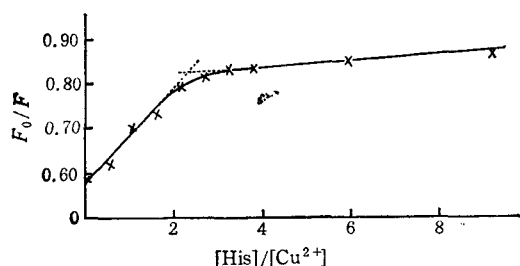


图 2 一些金属离子对人血清白蛋白荧光的猝灭

Fig. 2 Quenching effect of some metal ions on the fluorescence of HSA at 350nm

[HSA] = 157.2×10^{-6} mol/L图 3 L-组氨酸对 Cu^{2+} -HSA 荧光强度的影响Fig.3 The effect of L-histidine on the fluorescence of Cu^{2+} -HSA[HSA] = 157.2×10^{-6} mol/L

的 Cu^{2+} 浓度之后,人血清白蛋白 350nm 处的荧光增强趋于缓慢,基本上可认为不再随 L-组氨酸浓度的增加而变化。

将各种金属离子对人血清白蛋白荧光的猝灭归因于离子碰撞运动所引起的动态猝灭,由图 1 和图 2 可得表观 Stern-Volmer 常数(见表 1)。由于生物分子的荧光寿命约为 10ns 数量级^[9],由(2)式可算得各种金属离子的表观猝灭常数 K_q (见表 1)。

各种猝灭剂对生物分子的最大扩散碰撞猝灭常数约为 $2.0 \times 10^{10}(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$ ^[10],由表中数据可以看出, Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子对人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 ($2.0 \times 10^{10}(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$),表明这些金属离子对人血清白蛋白荧光的猝灭并不是由于动态碰撞引起的。Maurice 等^[11]在蛋白质的荧光猝灭研究中指出,重金属离子对

表 1 一些金属离子的猝灭常数

Table 1 Quenching Constants for Some metal ions

金属离子 metal ions	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Mn^{2+}	Eu^{3+}	Cr^{3+}	Co^{2+}
$K_D(\text{mol/L})^{-1}$	967 3 929	126	138	76.3	76.3	46.4
$K_q \times 10^{-10}$ ($\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$	96.7 393	12.6	13.8	7.63	7.63	4.64

蛋白质荧光的猝灭能力与金属离子在蛋白质中的结合部位有关。因此,表中所列金属离子对人血清白蛋白荧光的猝灭是由于金属离子与白蛋白结合所致。

由图 1 可看出, Cu^{2+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭在 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{HSA}] = 1$ 附近出现明显的拐点,表明人血清白蛋白有两类 Cu^{2+} 结合部位。第一类结合部位(强结合部位)可结合一个 Cu^{2+} ,且该部位结合 Cu^{2+} 后对 214 位色氨酸荧光的猝灭效应小于第二类 Cu^{2+} 结合部位。同样条件下,电子构型满壳层的 Ca^{2+} 对人血清白蛋白的荧光无猝灭效应,表明 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Eu^{3+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭也不是由于形成不发荧光的复合物,而是由于结合在人血清白蛋白上的金属离子与 214 位色氨酸残基之间的无辐射能量转移,使得人血清白蛋白的荧光被部分猝灭。

由图 1 和图 2 可见, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Eu^{3+} 在人血清白蛋白上有 8 个以上的结合部位,这与其它方法^[7,12,13]所测得结果是一致的。

图 3 表明, L-组氨酸可阻止 Cu^{2+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭,即向人血清白蛋白中加入等量的 Cu^{2+} 后,逐渐加入 L-组氨酸可使 Cu^{2+} 猝灭的荧光逐渐去猝灭。紫外吸收光谱测定表明^[7], L-组氨酸可与人血清白蛋白竞争 Cu^{2+} ,形成 $\text{Cu}^{2+}(\text{His})_2$ 络合物。由图 3 可见,当向人血清白蛋白溶液中加入等量的 Cu^{2+} 后,其荧光强度减弱,逐渐向该体系中滴加 L-组氨酸,结合在人血清白蛋白第一类结合部位的 Cu^{2+} 逐渐被 L-组氨酸活动化,形成 $\text{Cu}^{2+}(\text{His})_2$ 络合物,从而使人血清白蛋白荧光强度逐渐增强,当

所有的 Cu^{2+} 都与 L-组氨酸形成络合物后, 人血清白蛋白的荧光几乎不再随 L-组氨酸的加入而变化。即 L-组氨酸对 Cu^{2+} -HSA 荧光强度的影响也表明, Cu^{2+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭是由于无辐射能量转移引起的。

按照 Förster 型无辐射能量转移机理, Cu^{2+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭与能量给予体(214 位色氨酸残基)及能量接受体(结合在人血清白蛋白第一类结合部位的 Cu^{2+})间的距离 r 有关。由(6)式知, 我们可使用图 4, 由(7)式计算光谱重叠积分 J :

$$J = \sum_{\lambda} F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum_{\lambda} F(\lambda) \Delta\lambda \quad (7)$$

由(7)式算得的 $J = 2.21 \times 10^{-18} (\text{cm})^6 (\text{mol})^{-1}$

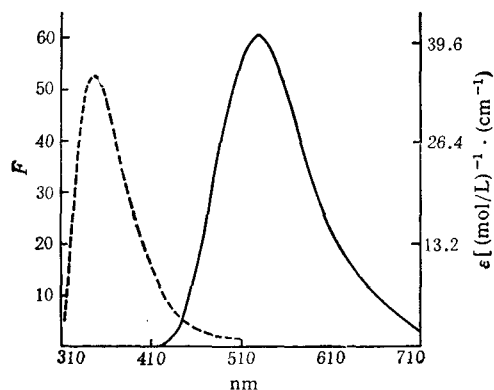


图 4 HSA 荧光光谱与 Cu^{2+} -HSA 吸收光谱的重叠

Fig.4 Spectral Overlap between the absorption Spectrum of Cu^{2+} -HSA and the fluorescence spectrum of HSA

----: 荧光光谱 (fluorescence)
—: 吸收光谱 (absorption spectrum)

$\text{L})^{-1}$. 按照文献[8], 取 $K^2 = 2/3$, $\phi = 0.13$, $n = 1.33$, 则由(5)式可得 $R_0 = 0.57 \text{ nm}$.

由图 1 可以看出, 当 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{HSA}] \approx 1$ 时, 若将 Cu^{2+} 对人血清白蛋白荧光的猝灭全部归因于无辐射能量转移, 则可计算出 214 位色氨酸残基向第一类人血清白蛋白结合 Cu^{2+} 的无辐射能量转移效率 E 为 1.2%, 由 E 和 R_0 值可根据(4)式算得人血清白蛋白中 214 位色氨酸残基与第一类 Cu^{2+} 结合部位间的距离 r 为 1.20 nm.

由图 1 还可以看出, 人血清白蛋白第二类 Cu^{2+} 结合部位比第一类 Cu^{2+} 结合部位更接近 214 位色氨酸残基。

参 考 文 献

- 1 Kragh-Hansen U. *Pharmacological Reviews*, 1981; **33**(1):17
- 2 Gurd F R N et al. *J Am Chem Soc.* 1952; **74**:670
- 3 Tanford C. *J Am Chem Soc.* 1952; **74**:211
- 4 Martin N M et al. *Biochem J*, 1953; **54**:642
- 5 Gurd F R N et al. *J Am Chem Soc.* 1954; **76**:187
- 6 杨斌盛, 杨频等. 科学通报, 1984; **29**(17): 1049
- 7 杨斌盛, 杨频. 生物化学与生物物理学报, 1989; **21**:245
- 8 杨斌盛, 杨频. 生物化学与生物物理学报, 1988; **20**: 499
- 9 Lakowicz J R, Weber G. *Biochemistry*, 1973; **12**: 4161
- 10 Ware W R. *J Phys Chem.* 1962; **66**:455
- 11 Maurice R et al. *Anal Biochem*, 1981; **114**:199
- 12 Nandedkar A K N et al. *Int J Rept Protein Res*, 1973; **5**:279
- 13 Nandedkar A K N et al. *Bioinorg Chem*, 1972; **2**: 149

FLUORESCENCE QUENCHING STUDIES ON THE ACTION OF METAL IONS WITH HUMAN SERUM ALBUMIN

Yang Binsheng Yang Pin

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

ABSTRACT

In the paper, the action of metal ions on the human serum albumin had been investigated by fluorescence quenching method. The results showed that Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Eu^{3+} , Ni^{2+} may bind to human serum albumin and that the fluorescence of human serum

albumin may be quenched by nonradiative energy transfer. In terms of Förster type dipole-dipole nonradiative energy transfer the distance between the Trp-214 and the bound Cu^{2+} in the first copper-binding site was calculated and found to be about 1.20nm.

Key words Fluorescence Quenching, Human Serum Albumin, Metal Ions

大鼠软骨 II 型胶原体外胶原原纤维的形成

付志厚* 张矢远

(西安医科大学骨病研究所, 西安 710061)

提 要

建立了 II 型胶原的提取和纯化方法, 观察大鼠软骨 II 型胶原体外胶原原纤维形成的动力学、胶原原纤维的稳定性和超微结构。结果表明, II 型胶原静止期、增长期分别为 15、120min, 增长期凝胶化速率 0.0060, 凝胶可复性 13.58%, 胶原原纤维呈典型的具有 64nm 周期横纹的自然纤维结构, 但纤维直径较体内增长。这些对研究体内胶原原纤维的形成过程及调节机制具有重要意义。

关键词 原纤维形成, II 型胶原, 软骨

软骨胶原约占软骨湿重的 20—30%, 是软骨基质的主要有机成分。目前发现软骨含有 5 种不同基因类型的胶原, 即 II、VI、IX、X 和 XI 型胶原, 其中 II 型胶原约占 80—90%^[1]。II、IX、XI 型胶原原纤维以 8:1:1 的比例共同构成软骨胶原纤维网, 在三维空间内充分容纳水合的蛋白多糖, 使软骨组织既能承受负荷又具有韧性, 胶原的结构和微构型对维持软骨组织的结构完整和正常功能起重要作用^[2]。

前胶原由软骨细胞合成后, 被分泌到细胞外间质, 经内切肽酶水解去除伸直端前肽, 生成原胶原。原胶原分子 1/4 交错排列, 聚合成具有 64nm 周期横纹的胶原原纤维。体内调节胶原原纤维形成的因素有: (a.) 翻译后修饰, 如胶原的糖化、交联和前肽的去除。(b.) 胶原与其它基质大分子的交互作用, 如与蛋白多糖、纤维连接素和细胞成分 6 μ -16 的交互作用^[3,4]。

体内胶原原纤维的形成是一个复杂的过程, 其机理目前尚不明了。原胶原分子在体外生理条件下可自动聚合成自然纤维, 从而为研究胶原原纤维的形成过程和调节机制提供了良

好的体外模型。有关体外 I 型胶原原纤维形成的研究已有较多的报道^[5,6], 而 II 型胶原原纤维形成的研究国内尚未见报道。软骨含有多种有机成分, 且 II 型胶原可溶性低, 因而软骨 II 型胶原的提取和纯化较其它类型的间质胶原困难, 给研究工作带来不便。本文建立了 II 型胶原的提取和纯化方法, 并观察了大鼠软骨 II 型胶原体外胶原原纤维形成的动力学、胶原原纤维的稳定性及其超微结构。从而为研究 II 型胶原的生理学和病理学提供实验资料。

1 材料与 方法

1.1 II 型胶原的提取和纯化

取 2 个半月月龄的 SD 大鼠 12 只, 雌雄各半, 处死, 分离肋软骨及剑突, 将 4 只大鼠软骨随机合并, 称重, 放液氮中备用。

备用样品在 4℃ (以下操作同) 用预冷的 10mmol/L EDTA 溶液将软骨组织匀浆, 12 000

* 现在济南军区总医院骨科工作, 济南 250031。

收稿日期: 1990-11-14 修回日期: 1991-10-04