[Hg(SCN)₄]²⁻与蛋白质相互作用的共振瑞利散射光谱及其分析应用

田伦富, 刘忠芳, 孔玲, 胡小莉, 刘绍璞*

发光与实时分析教育部重点实验室, 西南大学化学化工学院, 重庆 400715

* 联系人, E-mail: liusp@swu.edu.cn

2010-09-07 收稿, 2010-12-02 接受

国家自然科学基金(20875078)、发光与实时分析重庆市重点实验室(2006CA8006)和西南大学大型仪器设备开放基金资助项目

摘要 在 pH 1.0~4.5 的稀硫酸介质中, [Hg(SCN)₄]²⁻ 配阴离子与人血清白蛋白(HSA)、α-糜蛋白酶(α-Chy)、牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(Lyso)和γ-球蛋白(γ-G)等蛋白质反应形成复合物, 此时将导致共振瑞利散射(RRS)的显著增强, 也能引起吸收光谱的变化和荧光猝灭, 同时还观察到圆二色(CD)光谱特征的改变. 本文主要研究[Hg(SCN)₄]²⁻-蛋白质复合物的 RRS 光谱特征、适宜的反应条件和影响因素, 以及分析化学性质, 并以[Hg(SCN)₄]²⁻-Lyso 体系为例, 结合吸收、荧光和圆二色光谱的变化, 对复合物的结合位点、结合模式以及散射增强的原因进行了讨论. RRS 法具有较高的灵敏度, 它对不同蛋白质的检出限在 4.6~10.8 ng/mL 之间, 据此建立了以[Hg(SCN)₄]²⁻ 配阴离子作探针测定人血液和尿液中蛋白质的新方法.

关键词

蛋白质
[Hg(SCN)₄]²⁻
共振瑞利散射
吸收光谱
荧光猝灭

金属离子及其配合物与蛋白质的结合作用不仅影响蛋白质的结构和构象, 也与蛋白质的活性和生物功能密切相关. 汞及其化合物对环境、人和动物的健康危害极大, 研究它与蛋白质的相互作用对于了解其生物功能和致毒机理有重要作用. 但是目前的研究工作偏重于汞(II)离子本身与蛋白质的作用, 包括一些使用紫外光谱法^[1-3]、荧光法^[4]、电化学法^[5,6]、圆二色光谱^[2, 7, 8]、红外光谱法^[9]、拉曼光谱^[8, 10]、质谱^[6, 7, 11]、核磁共振^[12]和微量热法^[13]的研究工作. 实际上由于汞(II)是一种有强配位能力的金属离子, 它能与环境中的常见阴离子形成配合物, 例如与卤离子(Cl⁻, Br⁻, I⁻)、SCN⁻等形成配阴离子. 汞(II)配阴离子与汞(II)离子相比不仅体积更大, 而且带有相反的电荷, 因而它们与蛋白质作用时与汞(II)离子显示出不同的结合能力、结合方式和结合位置, 也对蛋白质的结构、构象以及生物活性、生物功能造成不同的影响, 汞(II)配阴离子致毒作用的大小和机

理也会与汞(II)离子有所差异. 因此研究汞(II)配阴离子与蛋白质的相互作用同样具有重要作用.

共振瑞利散射(RRS)光谱法是 20 世纪 90 年代发展起来的分析技术^[14,15], 它对生物大分子的非键合作用, 如缔合、聚集、偶极-偶极作用、氢键作用、静电引力、疏水作用和芳基堆集作用等作用力以及分子大小、形状和构象变化较为敏锐, 因此可以作为研究生物大分子和小分子之间相互作用的有用手段, 并具有良好的应用前景. 同时该方法还具有灵敏度高、操作简单等优点, 因此引起了人们的广泛关注. 目前 RRS 法在药物、有机物和无机离子^[16-19]的分析中得到越来越多的应用, 并且已成为研究核酸、蛋白质、糖类生物大分子和小分子相互作用的一种有用方法^[20-24]. 在 RRS 法测定蛋白质的研究中, 多数利用蛋白质与有机染料(如酸性三苯甲烷染料^[25,26]、酸性吡啶染料^[27,28]和酸性偶氮染料^[29,30]等)的缔合反应体系, 但金属无机配合物与蛋白质之间的反应及其

英文引用格式: Tian L F, Liu Z F, Kong L, et al. The interaction between [Hg(SCN)₄]²⁻ and proteins by absorption, fluorescence and resonance Rayleigh scattering spectra and their analytical applications (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2011, 56: 396-406

对 RRS 的影响研究较少。

我们的研究发现,单纯的 Hg^{2+} , SCN^- 与蛋白质共存时几乎不能引起 RRS 信号的变化,但是当 Hg^{2+} 与过量的 SCN^- 反应形成配阴离子 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 后,能进一步与蛋白质反应形成结合产物并引起散射显著增强,与此同时也观察到吸收光谱的变化和蛋白质荧光猝灭。本文研究了 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与人血清白蛋白(HSA)、 α -糜蛋白酶(α -Chy)、牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(Lyso)和 γ -球蛋白(γ -G)等 5 种蛋白质相互作用的适宜条件,及反应产物对 RRS 光谱的影响。以 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系为例,通过 RRS 光谱特性并结合吸收、荧光和圆二色光谱探讨了 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与 Lyso 的相互作用力和结合位点以及构象变化,推测了结合模式,并讨论了散射增强的原因。此外,由于散射增强(ΔI_{RRS})在一定范围内与蛋白质的浓度成正比,该方法可用于蛋白质的定量测定,对不同蛋白质的检出限在 4.6~10.8 ng/mL,灵敏度高于目前的一些常用方法。因此用 RRS 法研究 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 配阴离子与蛋白质的相互作用不仅为阐明金属配合物与蛋白质的相互作用提供更加丰富的新信息,也为发展高灵敏度定量测定痕量蛋白质的新方法创造了条件。

1 实验

(i) 主要仪器和试剂。Hitachi F-2500 荧光分光光度计(日立公司,日本),用于记录荧光和共振瑞利散射光谱,并测量荧光和散射强度;UV-8500 型紫外分光光度计(上海天美公司,中国),用于记录吸收光谱和测量吸光度;J-810 圆二色光谱仪(Jasco,日本),用于记录圆二色光谱和测量峰强度。

蛋白质溶液:人血清白蛋白(HSA,美国 Sigma 公司)、 α -糜蛋白酶(α -Chy,美国 Sigma 公司)、牛血清白蛋白(BSA,北京元亨圣马生物技术研究所)、 γ -球蛋白(γ -G,美国 Sigma 公司)、溶菌酶(Lyso,华美生物工程公司)均为 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的水溶液,于 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 温度下储存。 H_2SO_4 (国营重庆无机化学试剂厂)溶液:0.05 mol/L; HgCl_2 (贵州省铜仁化学试剂厂试剂公司)溶液: 2.0×10^{-3} mol/L; NaSCN(上海化学试剂总厂)溶液:0.2 mol/L。

实验用二次蒸馏水,所用试剂均为分析纯。

(ii) 实验方法。于 10 mL 比色管中,分别加入 1.0 mL 0.05 mol/L H_2SO_4 溶液,1.0 mL 2.0×10^{-3} mol/L

HgCl_2 溶液,1.2 mL 0.2 mol/L NaSCN 溶液,充分混匀;10 min 后,加入适量蛋白质,用水稀释至刻度并摇匀;10 min 后于荧光光度计上以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 方式进行同步扫描,记录 RRS 光谱,并分别于各种反应物最大的散射强度波长处测定样品和试剂空白的 RRS 强度 I 及 I_0 , $\Delta I = I - I_0$ 。同时依次移取 1.0 mL 0.05 mol/L H_2SO_4 溶液,一定体积的 2.0×10^{-5} mol/L HgCl_2 溶液,1.0 mL 0.02 mol/L NaSCN 溶液,充分混匀;10 min 后,加入适量 5.0×10^{-6} mol/L 蛋白质溶液,用水稀释至 10 mL 并摇匀,10 min 后记录蛋白质与 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 混合前后的吸收光谱、荧光光谱和圆二色光谱。

2 结果与讨论

2.1 光谱特征

(1) 吸收光谱。研究了 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与不同蛋白质反应体系的吸收光谱,结果如图 1 和表 1 所示。由图 1 和表 1 可以看出, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 配阴离子在 250 nm

图 1 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -蛋白质体系的吸收光谱

(a) $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系。1, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ (以水作参比); 2, Lyso (以水作参比); 3, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系 (以 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 作参比); 4, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系 (以水作参比)。 (b) $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - γ -G 体系。1, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ (以水作参比); 2, γ -G (以水作参比); 3, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - γ -G 体系 (以 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 作参比); 4, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - γ -G 体系 (以水作参比)。

表1 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -蛋白质体系的吸收光谱特征^{a)}

反应体系	蛋白质			复合物			$\Delta\lambda$ (nm)	ε'/ε
	$\lambda_{\max}$ (nm)	A	ε ($10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$\lambda_{\max}$ (nm)	A	ε' ($10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)		
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso	279	0.08	0.40	283	0.36	1.80	4	4.50
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -BSA	276	0.11	0.55	282	0.48	2.40	6	4.36
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -HSA	277	0.11	0.55	283	0.44	2.20	5	4.00
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - α -Chy	278	0.09	0.45	281	0.27	1.35	3	3.00
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - γ -G	277	0.37	1.85	282	0.69	3.45	5	1.86

a) $\lambda_{\max}$: 最大吸收波长, A: 吸收强度, ε : 摩尔吸光系数, $[\text{Hg}(\text{II})]=[\text{蛋白质}]=2.0 \mu\text{mol/L}$

附近的近紫外区几乎无吸收, 而上述蛋白质由于含有数量不同的芳香族氨基酸残基, 它们在 276~279 nm 附近有一定的光吸收, 除 γ -G 有较强的光吸收(摩尔吸光系数 $\varepsilon=1.85 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)外, 其余蛋白质光吸收较微弱, ε 值在 $(0.40 \sim 0.55) \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 之间. 但是当 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与蛋白质形成复合物后, 可以观察到吸收光谱略有红移(4~6 nm 之间), 吸光度则明显提高, ε 值成倍增大, 其中 Lyso, BSA 和 HSA 体系提高 4 倍以上, α -Chy 体系提高 3 倍, γ -G 体系也提高 1.86 倍. 因此从吸收光谱的变化可以明确观察到 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与蛋白质发生了相互作用, 而且 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 是直接作用于蛋白质的芳香族残基. 此外反应产物吸光度的增强也为用 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 分光光度法测定蛋白质(特别是 Lyso, BSA 和 HSA)创造了条件.

(2) 荧光光谱. 研究了 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -蛋白质反应体系的荧光光谱, 结果如图 2 和表 2 所示. 从图 2 和表 2 可以看出, 各蛋白质具有强度不同的荧光, 其中以 γ -G 最高, 而 Lyso 的强度最低, 这与它们的光吸收趋势是一致的. 而它们的最大发射波长分别在 333~351 nm 之间, 这与发光团特别是色氨酸残基在蛋白质中的存在状态有关. 在 330 nm 附近色氨酸残基可能主要处于折叠状态, 而在 350 nm 附近则处于“自由的”或非折叠状态^[31]. 当上述蛋白质与 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 反应并形成复合物时, 虽未观察到荧光发射波长的变化, 但是其荧光强度均发生不同程度的猝灭, 当等摩尔的 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与蛋白质反应时, 其荧光猝灭率分别在 6.32%~34.44%之间, 可见用 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 作猝灭剂时, 它对 BSA 最灵敏, 其次是 HSA, 但对于 Lyso 和 α -Chy 的荧光猝灭率较低. 从荧光猝灭也可以看出, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 能与蛋白质芳香族氨基酸残基上的荧光团发生相互作用, 形成结合产物而导致荧光猝灭.

图2 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -蛋白质体系的荧光光谱

(a) $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系: 1, Lyso $2.0 \mu\text{mol/L}$; 2~8, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso; $(\text{Hg}(\text{II})): 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0 \mu\text{mol/L}$; $\text{NaSCN}: 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. (b) $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -BSA 体系: 1, BSA $2.0 \mu\text{mol/L}$; 2~6, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -BSA; $(\text{Hg}(\text{II})): 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 \mu\text{mol/L}$; $\text{NaSCN}: 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

(3) RRS 光谱. $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -蛋白质反应体系的 RRS 光谱如图 3 所示. 从图 3(a)可以看出, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 和 5 种蛋白质本身的散射强度均较微弱, 但是当两者反应形成结合产物时将导致 RRS 的显著增强, 并出现新的 RRS 光谱. 它们的光谱特征相似并且最大散射波长均位于 340 nm 附近. 但是其相对散射强度却有一定的差异, 其中 ΔI 值最高的是 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系, 其次是 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与 α -Chy, BSA 和 γ -G 体系. 而 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -HSA 体系的相对强度最低.

表 2 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -蛋白质体系的荧光光谱特征^{a)}

反应体系	蛋白质			复合物			猝灭率(%)
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	F	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	F	
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso	280	343	760	280	343	712	6.32
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -BSA	280	330	2828	280	332	1854	34.44
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -HSA	280	350	2132	280	351	1579	25.94
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - α -Chy	280	338	2157	280	338	1981	8.16
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - γ -G	280	341	5164	280	341	4227	18.19

a) $[\text{Hg}(\text{II})]=[\text{protein}]=2.0 \mu\text{mol/L}$, λ_{ex} 和 λ_{em} : 最大激发波长和发射波长, F : 荧光强度

图 3 RRS 光谱

(a) $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -蛋白质体系: 1, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$; 2, HSA; 3, γ -G; 4, BSA; 5, α -Chy; 6, Lyso; 7, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -HSA; 8, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - γ -G; 9, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -BSA; 10, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - α -Chy; 11, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso; 蛋白质: $3.0 \mu\text{g/mL}$; $\text{Hg}(\text{II})$: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, NaSCN : $2.4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$.
(b) $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系: 1, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$; 2~7, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso; (Lyso: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 $\mu\text{g/mL}$); $\text{Hg}(\text{II})$: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; NaSCN : $2.4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$

并且在上述 5 种体系中散射增强(ΔI)均在一定范围内与蛋白质的浓度成正比, 因此可用于蛋白质的定量测定. 其中作为最灵敏的 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系的散射增强(ΔI)与蛋白质浓度之间的定量关系示于图 3(b)中.

由于反应前后 RRS 光谱的变化较吸收光谱和荧光光谱更为显著, 因此用 RRS 法研究这类金属配合物与蛋白质间的相互作用更为有利, 而且建立的对蛋白质的 RRS 定量测定方法将具有更高的灵敏度.

2.2 适宜的反应条件

(1) 酸度的影响. 分别实验了 BR、盐酸、NaAc-HAc、硝酸和 H_2SO_4 等多种介质对反应体系 RRS 的影响, 结果表明, 用 H_2SO_4 作反应介质效果最好, 并且用稀 H_2SO_4 调节酸度, pH 在 1.0~4.5 范围内变化时, 体系的 RRS 强度(ΔI_{RRS})基本不变(图 4), 酸度过高或者过低均会使散射强度逐渐降低. 实验中选择 pH 2(0.005 mol/L 的 H_2SO_4 介质)作为反应酸度.

(2) $\text{Hg}(\text{II})$ 和 SCN^- 浓度影响. 由于 SCN^- 与 $\text{Hg}(\text{II})$ 的反应在溶液中存在如下平衡:

故要使 $\text{Hg}(\text{II})$ 完全转变成 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$, 必须有过量的 SCN^- 存在. 实验表明, NaSCN 的浓度为 0.024 mol/L 时, RRS 强度达到最大值, 并在 0.020~0.080 mol/L 之间变化不大, 继续增大 NaSCN 用量, 空白将增大, 故 NaSCN 的浓度选用 0.024 mol/L. 在过量 SCN^- 存在下, $\text{Hg}(\text{II})$ 均以 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 配阴离子型体存在, 故 $\text{Hg}(\text{II})$ 浓度可视为 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 浓度. 本实验条件下, $\text{Hg}(\text{II})$ 浓度不足时, 散射强度较低; 当 $\text{Hg}(\text{II})$ 浓度增至 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, RRS 强度达到最大;

图 4 酸度的影响

1, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -HSA; 2, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - γ -G; 3, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -BSA; 4, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ - α -Chy; 5, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso; 蛋白质: $2.0 \mu\text{g/mL}$; $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$

进一步增大 Hg(II) 的浓度至 1.0×10^{-3} mol/L, ΔI_{RRS} 几乎不变. 但是当 Hg(II) 的浓度超过 1.0×10^{-3} mol/L 时, 体系会逐渐出现浑浊, 故以下实验 Hg(II) 的浓度选用 2.0×10^{-4} mol/L.

(3) 温度的影响及共振瑞利散射强度(I_{RRS})的稳定性. 实验了温度对体系 RRS 强度的影响, 结果表明, 在 10~30℃ 条件下, RRS 强度基本保持不变. 因此, 实验在室温下进行即可. 10 min 左右体系散射强度达到最大, 此后至少可以稳定 12 h, 因此散射信号有较好的稳定性.

(4) 离子强度的影响. 以加入 NaCl 溶液考察了离子强度对蛋白质体系的影响. 实验表明, 当 NaCl 浓度小于 0.05 mol/L 时对体系的散射强度基本不产生影响, 但进一步增加 NaCl 浓度, 散射强度会有不同程度的降低. 这说明在 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与蛋白质的结合中, 静电引力发挥着重要的作用.

(5) 有机溶剂的影响. 研究了有机溶剂乙醇、甲醇和丙酮对共振散射强度的影响. 结果表明, 随着乙醇、甲醇和丙酮的加入, 溶液的共振散射均降低, 且乙醇的抑制作用最强. 有机溶剂的加入能使疏水性的结合产物部分溶解于有机溶剂中, 使产物与水的疏水界面减少或消失, 这些均能导致 RRS 强度的降低.

2.3 方法的灵敏度

由于反应产物的 RRS 增强(ΔI)在一定范围内与蛋白质浓度成正比, 因此可用于蛋白质的测定. RRS 法对测定蛋白质的线性范围、一元线性回归方程、线

性范围、相关系数和检出限列于表 3. RRS 法对不同蛋白质的检出限在 4.6~10.8 ng/mL 之间, 灵敏度高于常用的分光光度法^[32,33], 也高于多数荧光法^[34,35]、化学发光法^[36,37]、电化学法^[38,39]和以有机染料及其金属配合物作探针的 RRS 法^[40,41], 这有利于痕量蛋白质测定.

2.4 方法的选择性及其分析应用

用以 HSA 为例的 RRS 法研究了共存金属离子、无机酸根、一些氨基酸、糖类对体系的影响, 结果列于表 4. 由表 4 可以看出, 多种常见金属离子(如钾、钙、镁、铁)、氨基酸(半胱氨酸、甘氨酸、酪氨酸和精氨酸等)、常见糖类和无机酸根基本不影响蛋白质的测定. 因此, 该方法具有较好的选择性.

尿样中总蛋白的测定: 取正常人新鲜尿样 3 份, 分别用水稀释 10 倍后各取适量溶液按实验方法进行测定, 实验结果如表 5 所示. 本方法所得结果与考马斯亮蓝法^[42](CBB G250)基本一致.

人血清中总蛋白的测定: 将正常人新鲜血清(由西南大学校医院提供)3 份分别用水稀释 2000 倍, 各取适量溶液按实验方法进行测定, 结果列于表 5. 本方法所得结果与考马斯亮蓝法(CBB G250)基本一致.

2.5 蛋白质与 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 的相互作用以及散射增强的原因

以下以最灵敏的 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系为例研究它们相互作用的机理、结合模式和散射增强的原因.

表 3 测定蛋白质的检出限和相关系数

方法	测定对象	一元线性回归方程 (c , $\mu\text{g/mL}$)	相关系数(r)	线性范围 (c , $\mu\text{g/mL}$)	检出限 (3σ , ng/mL)
分光光度法	Lyso	$\Delta A = 0.0051 + 1.3 \times 10^{-2} c$	0.9971	0.31~52	93
	α -Chy	$\Delta A = -0.0087 + 5.4 \times 10^{-3} c$	0.9982	0.74~56	222
	BSA	$\Delta A = 0.0093 + 3.7 \times 10^{-3} c$	0.9975	1.08~150	325
	γ -G	$\Delta A = -0.0056 + 2.3 \times 10^{-3} c$	0.9983	1.74~300	522
	HSA	$\Delta A = 0.0078 + 3.2 \times 10^{-3} c$	0.9984	1.24~150	371
RRS 法	Lyso	$\Delta I = 26.67 + 536.88 c$	0.9996	0.017~6.0	4.6
	α -Chy	$\Delta I = 18.8 + 356.3 c$	0.9996	0.026~6.0	6.9
	BSA	$\Delta I = 13.2 + 344.0 c$	0.9994	0.027~6.0	7.2
	γ -G	$\Delta I = 7.6 + 294.4 c$	0.9996	0.031~6.0	8.4
	HSA	$\Delta I = -5.6 + 230.74 c$	0.9996	0.040~6.0	10.8

表 4 共存物质的影响(HSA 浓度为 2.0 μg/mL)

共存物质	共存物质倍数	相对误差(%)	共存物质	共存物质倍数	相对误差(%)
NH ₄ ⁺	90	-3.1	甘氨酸	250	-3.1
K ⁺	102	4.3	L-酪氨酸	60	3.4
Ca ²⁺	120	2.0	L-色氨酸	35	4.2
Mg ²⁺	122	3.6	L-组氨酸	40	4.8
Co ²⁺	11	4.5	L-苯丙氨酸	50	3.4
Ni ²⁺	7	3.7	DL-精氨酸	50	4.1
Zn ²⁺	6	2.2	麦芽糖	180	4.9
Cu ²⁺	9	3.3	葡萄糖	50	3.6
Cd ²⁺	11	4.1	乳糖	50	3.7
Mn ²⁺	12	2.8	柠檬酸根	10	4.7
Al ³⁺	14	3.2	VB ₁	20	3.3
Fe ³⁺	19	2.7	DNA	1	4.2
NO ₃ ⁻	310	-3.1	胰岛素	15	3.4
Br ⁻	207	4.3	胃蛋白酶	32	3.9
CH ₃ COO ⁻	236	-2.0	可溶性淀粉	7	4.6
PO ₄ ³⁻	17	-2.6	尿素	100	2.9
L-半胱氨酸	35	4.0	烟酸	120	2.4

表 5 人血清和尿液样品中总蛋白测定结果

样品	测得值 ^{a)} (mg/mL), 相对标准偏差(%), <i>n</i> =5		考马斯亮蓝法 (mg/mL), <i>n</i> =5	加入量 ^{b)} (mg/mL)	测得总量(mg/mL), <i>n</i> =5	回收率(%)
人尿样 No.1	4.21×10 ⁻²	2.6	4.33×10 ⁻²	20.0×10 ⁻²	24.16×10 ⁻²	99.7
人尿样 No.2	4.26×10 ⁻²	3.1	4.52×10 ⁻²	20.0×10 ⁻²	24.09×10 ⁻²	99.2
人尿样 No.3	4.52×10 ⁻²	2.8	4.64×10 ⁻²	20.0×10 ⁻²	24.68×10 ⁻²	100.8
人血清样 No.1	69.84	3.3	70.33	10.0	79.43	95.9
人血清样 No.2	71.21	2.3	71.82	10.0	80.88	96.7
人血清样 No.3	74.56	2.9	74.89	10.0	84.42	98.6

a) 血清样中蛋白质的测定均以 HSA:γ-G=6.5:3.5 的混合溶液绘制工作曲线, 而人尿样则以 HSA 溶液绘制工作曲线. b) 血清中加入蛋白质混合溶液, 尿样中只加入 HSA 溶液

(1) [Hg(SCN)₄]²⁻ 与 Lyso 反应的主要作用力. (i) 静电引力: Lyso 是由 129 个氨基酸残基组成的单肽链蛋白质, 其中带正电荷的碱性氨基酸残基 17 个, 其中包括 11 个精氨酸(Arg)残基和 6 个赖氨酸(Lys)残基. 同时含有酸性氨基酸残基 9 个, 包括 7 个天冬氨酸(Asp)残基和 2 个谷氨酸(Glu)残基. 在实验的酸度条件下(pH 1.0~4.5 左右), 17 个碱性氨基酸残基均带正电荷, 而此时 7 个 Asp 和 2 个 Glu 多数不解离(在蛋白质中侧链 Asp 和 Glu 的 pK_a 值约为 4.0 和 4.5^[31]). 因此整个 Lyso 是以带多个正电荷的生物大阳离子形体存在, 它和 [Hg(SCN)₄]²⁻ 配阴离子之间能借助静电引力而发生相互作用. (ii) 配位作用: Hg(II) 的常见配位数为 6, 当它与过量的 SCN⁻ 反应形成 [Hg(SCN)₄]²⁻ 配合物时, 还空余 2 个配位位置, 它可进一步与含 S

或 N 作配位原子的配体结合, 形成配位饱和的配合物. 在 Lyso 中虽含有 8 个含-SH 的半胱氨酸(Cys)残基, 但是在蛋白质内全部形成二硫键而失去配位能力, 因此 [Hg(SCN)₄]²⁻ 很可能与 Lyso 中含杂环-NH 基的氨基酸残基(如色氨酸(Trp)残基或组氨酸(His)残基)配位, 形成更稳定的配位饱和的配合物. (iii) 疏水作用力: Lyso 虽然含有多个极性氨基酸残基并且在此条件下以大阳离子的形体存在, 但是它也含有更多的非极性氨基酸残基, 因此分子也具有较弱的疏水性. 对于 [Hg(SCN)₄]²⁻ 配阴离子而言, 也带有一定的疏水性, 它与大阳离子之间有形成疏水性离子缔合物的倾向(例如它与许多阳离子染料均易形成电中性离子缔合物), 因此 Lyso 大阳离子与 [Hg(SCN)₄]²⁻ 之间的疏水作用力也是促进两者结合的重要作用力.

(2) Lyso- $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 复合物可能的结合位点和结合模式. 我们用等摩尔连续变化法和摩尔比法测定了 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与 Lyso 的结合比, 结果为 1:1, 即在此条件下仅有 1 个 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 分子进入 Lyso 中. 已知溶菌酶是一个外形呈椭圆形的蛋白质(3.0 nm × 3.0 nm × 4.5 nm), 最大特点是有一个明显的横贯这个分子一面的裂缝^[31], 即一个狭长的凹穴. Lyso 与许多小分子底物作用时均发生在这凹穴中^[43]. Lyso 活性中心的氨基酸残基 Glu35 和 Asp52 即位于此凹穴中, 因此作为小分子的 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 在上述作用力的作用下极易进入这一凹穴中, 并与活性中心附近的 2 个带正电荷的碱性氨基酸残基借助静电引力而结合, 并中和 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 的负电荷. 与此同时, 从吸收光谱的变化和荧光猝灭可以看出, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 在与 Lyso 反应时直接作用于它的芳香族氨基酸残基. 根据 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 对 Lyso 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图(图 5)可以计算出它的猝灭常数为 $2.33 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (在 293 K 时), 根据生物大分子的平均荧光寿命 10^{-8} s 和 $K_{\text{sv}} = K_q \tau_0$ ^[44] 计算其双分子猝灭常数为 $2.33 \times 10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (表 6), 该值远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[44], 加之当 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与 Lyso 反应形成配合物时能导致吸收光谱的变化, 以及温度升高会导致荧光猝灭值(ΔF)降低, 这些都说明 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与 Lyso 中的荧光团(芳香族氨基酸残基)结合形成了复合物, 从而导致蛋白质荧光发生静态猝灭. Lyso 的荧光主要是由其芳香族氨基酸残基特别是 6 个 Trp 残基所产生的, 但是 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 并不能使 Lyso 的荧光完全猝灭. 我们用改进的 Stern-Volmer 公式, 以 $F_0/\Delta F$ 对 $1/[[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}]$

图 5 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 对 Lyso 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Lyso: 2.0 $\mu\text{mol/L}$; $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$: 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0 $\mu\text{mol/L}$

作图(图 6), 得出猝灭剂对荧光团的可及度 f_a^{-1} 为 0.32, 可以认为 Lyso 的 6 个 Trp 有 1/3(即 2 个)Trp 是可被猝灭剂 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 靠近并结合的.

在 Lyso 的凹穴附近最可能与 Hg(II)进一步配位的色氨酸残基是 Trp62, Trp63 和 Trp108, 但是由于 Trp62 和 Trp63 位置相邻, 要同时进入 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 内界进行配位将造成空间障碍, 也不利于六配位的正八面体配合物的形成. 因此只能是更靠近凹穴的 Trp62 参与配位. 而另一配位位置将由位置稍远的 Trp108 进入, 而中和 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 负电荷的可能是凹穴中的 Arg73 和 Lys97. 推测 Lyso 与 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 的结合模式如图 7 所示, 虽然精确的结合位点需要更多的实验依据, 但大体的结合位置是可以认定的.

(3) 散射增强的原因. $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 直接作用于 Lyso 的芳香族氨基酸残基特别是 Trp 是导致吸收光谱变化和荧光猝灭的主要原因, 而复合物的形成又能引起散射的显著增强. 通常结合产物体积(或分子量)的增大是散射增强的主要原因, 但是在这一反应体系中反应前后分子量变化甚微, 结合产物的分子量仅比 Lyso 高 3% 左右(从 Lyso 的 14300 到复合物的 14732.6). 因此, 在这里散射增强的原因主要不是因为分子体积增大, 可能的原因如下:

图 6 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 对 Lyso 荧光猝灭改进的 Stern-Volmer 图

Lyso: 2.0 $\mu\text{mol/L}$; $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$: 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0 $\mu\text{mol/L}$;
T: 293 K

表 6 不同温度下 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与 Lyso 相互作用的 Stern-Volmer 猝灭常数及相关参数

$T(\text{K})$	$K_{\text{sv}}(10^4 \text{ L mol}^{-1})$	$k_q(10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$	R
283	3.50	3.50	0.9982
293	2.33	2.33	0.9990
303	1.73	1.73	0.9986

图 7 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 复合物的结合位点和结合模式示意图

(i) 荧光-散射间共振能量转移作用. 从 RRS 光谱和荧光光谱的比较(图 8(a))可以看出, 散射光谱与荧光光谱有部分重叠, 而且 RRS 最强的 340~350 nm 区间恰好接近于最大荧光发射波长的 340 nm. 同时, 伴随着结合产物的荧光猝灭散射则同步增强(图 8(b)), 这说明当散射和荧光处于相同的频率时, 两者之间会因共振而发出能量交换和转移, 此时荧光能量部分转移至散射, 使得在荧光猝灭的同时散射增强.

(ii) 疏水性增强. 由于 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 是 2 价阴离子, 它们在水溶液中由于易形成水合物而显示出很低的散射, 但当 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 与质子化的蛋白质反应形成结合产物后, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 的负电荷被中和, Lyso 的正电荷也有所降低, 在结合部分形成电中性的疏水区域, 使蛋白质的表面性质发生变化. 它与水相会形成局部的疏水界面, 从而产生一种界面增强效应而使散射增强.

(iii) 蛋白质分子构象的变化. 早期的研究已表明不同分子形状对散射的影响, 认为球形分子的瑞利散射强度较低, 而棒形和无规线团的散射强度较高^[45]. 我们的研究也发现, 当 DNA 与阳离子表面活性剂反应形成拉长的线团状结构时, RRS 显著增强, 而当变为紧密小球时, 散射则显著降低^[46]. 这说明生物大分子的构象对于散射强度有明显的影响. Lyso 是一种椭圆形的球状分子, 它本身在水溶液中的散射较弱, 但是反应后结合产物的散射强度显著增加.

图 8 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso 体系 RRS 光谱和荧光光谱的比较以及变化趋势的比较

(a) RRS 光谱和荧光光谱的比较. 1, 2 分别为体系的 RRS 光谱和荧光光谱. (b) RRS 光谱和荧光光谱强度变化趋势比较. 1, 2 分别为体系的 RRS 强度和荧光强度

从 CD 光谱(图 9)可以看出, Lyso 是一种以 α -螺旋结构为主的蛋白质, 在 207 nm 和 221 nm 处有两个特征峰,

图9 Lyso与 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 配阴离子反应前后的CD光谱
Lyso: $0.4 \mu\text{mol/L}$; $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$: $0.8 \mu\text{mol/L}$

当与 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 形成结合产物后两个负峰明显消失,说明 Lyso 的构象在结合 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 时发生了变化,

不论是 Arg73 和 Lys97 与 $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 之间静电引力的结合或者是 Trp62 和 Trp108 与 Hg(II)的配位,特别是距离较远的 Trp108 必须拉近与中心离子的距离,这些都将导致 Lyso 的结构和构象改变并使原有的椭圆形结构发生扭曲和变形,从而产生有利于散射增强的变化。

由于上述因素的共同影响导致了散射的显著增强。因此 RRS 光谱不仅可作为研究生物大分子与小分子相互作用的有用手段,而且其高灵敏度和简易性也为建立测定某些生物大分子和小分子的新方法创造了条件,特别是对考察生物大分子及其反应产物的分子体积、形状、表面电荷、疏水性以及构象变化提供了新的信息,也为研究生物大分子(如蛋白质)与金属离子及其配合物之间的相互作用创造了条件。

参考文献

- 1 Zhou Y Q, Hu X Y, Dou C, et al. Structural studies on metal-serum albumin. IV. The interaction of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) with HSA and BSA. *Biophys Chem*, 1992, 42: 201–211
- 2 Leiva-Presa A, Capdevila M, González-Duarte P. Mercury(II) binding to metallothioneins: variables governing the formation and structural features of the mammalian Hg-MT species. *Eur J Biochem*, 2004, 271: 4872–4880
- 3 Zheng X Y, Pang E G, Li H Q, et al. Spectral studies on the interaction between mercuric ion and ApoCopC. *Chin J Chem*, 2007, 25: 630–634
- 4 Emilia B, Alessandro D, Leonardo L, et al. Application of mercury cold vapor atomic fluorescence spectrometry to the characterization of mercury-accessible -SH groups in native proteins. *Anal Biochem*, 1999, 274: 163–173
- 5 Castro C S, SouzaDe J R, Bloch C Jr. Investigations on the binding of mercury ions to albumins employing differential pulse voltammetry. *Protein Pept Lett*, 2003, 10: 155–164
- 6 Bond A M, Colton R, D'Agostino A, et al. An electrospray mass spectrometric and voltammetric study of horse heart cytochrome c in the presence of metal ions. *Inorg Chim Acta*, 1998, 267: 281–291
- 7 Stillman M J, Thomas D, Trevithick C, et al. Circular dichroism, kinetic and mass spectrometric studies of copper(I) and mercury(II) binding to metallothionein. *J Inorg Biochem*, 2000, 79: 11–19
- 8 Li Y, Yan X P, Chen C, et al. Human serum albumin-mercurial species interactions. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2277–2286
- 9 Nahar S, Tajmir-Riahi H A. Complexation of heavy metal cations Hg, Cd, and Pb with proteins of PSII: evidence for metal-sulfur binding and protein conformational transition by FTIR spectroscopy. *J Colloid Interface Sci*, 1996, 178: 648–656
- 10 Picaud T, Desbois A. Interaction of glutathione reductase with heavy metal: The binding of Hg(II) or Cd(II) to the reduced enzyme affects both the redox dithiol pair and the flavin. *Biochemistry*, 2006, 45: 15829–15837
- 11 Kershaw C J, Brown N L, Hobman J L. Zinc dependence of zinT (yodA) mutants and binding of zinc, cadmium and mercury by ZinT. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364: 66–71
- 12 Pesek J J, Schneider, J F. The detection of mercury, lead, and methylmercury binding sites on lysozyme by carbon-13NMR chemical shifts of the carboxylate groups. *J Inorg Biochem*, 1988, 32: 233–238
- 13 Wilcox D E. Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorg Chim Acta*, 2008, 361: 857–867
- 14 Pasternack R F, Collings P J. Resonance light scattering: A new technique for studying chromophore aggregation. *Science*, 1995, 269: 935–939
- 15 刘绍璞. 共振瑞利散射和共振非线性散射在分析化学中的应用. 汪尔康主编. 分析化学新进展. 北京: 科学出版社, 2002. 208–288

- 16 Fu S H, Liu Z F, Liu S P, et al. Study on the resonance Rayleigh scattering, second-order scattering and frequency doubling scattering spectra of the interactions of palladium (II)-ceftriaxone chelate with anionic surfactants and their analytical applications. *Talanta*, 2008, 75: 528–535
- 17 Yang Q L, Lu Q M, Liu Z F, et al. Resonance Rayleigh scattering spectra of ion-association nanoparticles of [Co(4-[(5-Chloro-2-pyridyl)azo]-1,3-diaminobenzene)₂]²⁺-sodium dodecyl benzene sulfonate system and its analytical application. *Anal Chim Acta*, 2009, 632: 115–121
- 18 Fan Y, Long Y F, Li Y F. A sensitive resonance light scattering spectrometry of trace Hg²⁺ with sulfur ion modified gold nanoparticles. *Anal Chim Acta*, 2009, 653: 207–211
- 19 Cui F L, Wang L, Cui Y R. Determination of bismuth in pharmaceutical products using methyltriphenylphosphonium bromide as a molecular probe by resonance light scattering technique. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43: 1033–1038
- 20 Pasternack R F, Bustamante C, Collings P J, et al. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 5393–5399
- 21 Huang C Z, Li K A, Tong S Y. Determination of nanograms of nucleic acids by their enhancement effect on the resonance light scattering of the cobalt(II)/4-[(5-chloro-2-pyridyl)azo]-1,3-diaminobenzene complex. *Anal Chem*, 1997, 69: 514–520
- 22 Liu S P, Yang Z, Liu Z F, et al. Resonance Rayleigh scattering method for the determination of proteins with gold nanoparticle probe. *Anal Biochem*, 2006, 353: 108–116
- 23 Huang K J, Wei C Y, Shi Y M, et al. The investigation of the interactions between CdSe quantum dots and human serum albumin by resonance Rayleigh scattering and second-order scattering spectra. *Spectrochim Acta Part A*, 2010, 75A: 1031–1035
- 24 Liu S P, Luo H Q, Li N B, et al. Resonance Rayleigh scattering study of the interaction of heparin with some basic diphenyl naphthyl-methane dyes. *Anal Chem*, 2001, 73: 3907–3914
- 25 Yue Q L, Song Z H, Dong F X. A study on photochemical behavior of lysozyme-bromophenol blue complex and its analytical application. *Spectrochim Acta Part A*, 2008, 69: 1097–1102
- 26 Dong L J, Li Y, Zhang Y H, et al. A flow injection sampling resonance light scattering system for total protein determination in human serum. *Spectrochim Acta Part A*, 2007, 66: 1317–1322
- 27 Chen Z G, Zhang T Y, Ren F L, et al. Determination of proteins at nanogram levels based on their Resonance light scattering decrease effect on the dibromo-o-nitrophenylfluorone-sodium lauroyl glutamate system. *Microchim Acta*, 2006, 153: 65–71
- 28 Cao Q E, Ding Z T, Fang R B, et al. A sensitive and rapid method for the determination of protein by the resonance Rayleigh light-scattering technique with pyrogallol red. *Analyst*, 2001, 126: 1444–1448
- 29 Li Y, Dong L J, Zhang Y H, et al. Determination of proteins by flow injection analysis coupled with the Rayleigh light scattering technique. *Talanta*, 2007, 71: 109–114
- 30 Feng S L, Pan Z H, Fan J. Determination of proteins at nanogram levels with Bordeaux red based on the enhancement of resonance light scattering. *Spectrochim Acta Part A*, 2006, 64: 574–579
- 31 惠特福德, 著, 魏群, 主译. 蛋白质: 结构与功能. 北京: 科学出版社, 2008
- 32 Sozgen K, Cekic S D, Tutem E, et al. Spectrophotometric total protein assay with copper(II)-neocuproine reagent in alkaline medium. *Talanta*, 2006, 68: 1601–1609
- 33 Zheng H, Mao Y X, Li D H, et al. Dye-binding protein assay using a long-wave-absorbing cyanine probe. *Anal Biochem*, 2003, 318: 86–90
- 34 Jiang C Q, Luo L. Lysozyme enhanced europium-metacycline complex fluorescence: A new spectrofluorimetric method for the determination of lysozyme. *Anal Chim Acta*, 2004, 511: 11–16
- 35 Chen X, Wei Q, Cai Y Y, et al. Determination of ultra trace amounts of protein by 4-chlorosulfo-(2'-hydroxylphenylazo)-rhodanine-Ti(IV) complex [CISARP-Ti(IV)] as the fluorescence spectral probe in AOT microemulsion. *Spectrochim Acta Part A*, 2009, 72: 1047–1053
- 36 Deftereos N T, Grekas N, Calokerinos A C. Flow-injection chemiluminescence determination of albumin. *Anal Chim Acta*, 2000, 403: 137–143
- 37 Huang C B, Zhang K, Liu X L, et al. A flow-injection chemiluminescence method for the determination of human serum albumin, using the reaction of fluorescein-human serum albumin-sodium hypochlorite by the enhancement effect of the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide. *Luminescence*, 2007, 22: 393–400
- 38 Hui N, Niu X L, Han J Y, et al. Voltammetric investigation on interaction of protein with chromotrope 2R and its analytical application. *Amino Acids*, 2009, 1438–2199
- 39 Marcela C. Rodríguez, Gustavo A. Label-free electrochemical aptasensor for the detection of lysozyme. *Talanta*, 2009, 7: 212–216
- 40 Feng S L, Pan Z H, Fan J. Determination of trace proteins with pyronine Y and SDS by resonance light scattering. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383: 1618–2642
- 41 Tang N L, Peng J Y. Determination of proteins with tetracarboxy manganese(II) phthalocyanine by resonance light scattering technique. *Spectrochim Acta Part A*, 2008, 71: 1246–1249

- 42 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254
- 43 沈同, 王镜岩. 生物化学. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1990. 280–281
- 44 Du J F, Li Y, Zhang Q, et al. Interaction of aloe-emodin with human serum albumin. *Chinese Sci Bull*, 2007, 52: 200–204
- 45 Tanford C. *Physical Chemistry of Macromolecules*. New York and Landon: John Wiley & Sons, Inc, 1961. 275–316
- 46 刘绍璞, 胡小莉, 罗红群, 等. 阳离子表面活性剂与核酸反应的共振 Rayleigh 散射光谱特性及其分析应用. *中国科学 B 辑: 化学*, 2002, 32: 18–26

The interaction between $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ and proteins by resonance Rayleigh scattering spectra and their analytical applications

TIAN LunFu, LIU ZhongFang, KONG Ling, HU XiaoLi & LIU ShaoPu*

Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis of Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

* Corresponding author (email: liusp@swu.edu.cn)

$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ in H_2SO_4 at pH 1.0–4.5 was reacted with proteins, including human serum albumin (HSA), α -chymotrypsin (α -Chy), bovine serum albumin (BSA), lysozyme (Lyso) and γ -globin (γ -G), to form complexes. As a result, the intensities of resonance Rayleigh scattering (RRS) were significantly enhanced. Changes in absorption, circular dichroism (CD) spectra and the fluorescence quenching of proteins were also observed. Attention was paid mainly to the RRS spectral characteristics of these complexes, suitable reaction conditions, influencing factors and a number of analytical properties. The changes in absorption, fluorescence and CD spectra for the $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Lyso system were used as an example to explore the binding sites, binding model and reasons for enhanced scattering. The RRS method had a high sensitivity and the detection limits (3σ) were 4.6–10.8 ng/mL for the proteins studied. A new method is thus established herein, using $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ as a probe for the determination of proteins in human serum and urine samples.

protein, $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$, resonance Rayleigh scattering, absorption spectra, fluorescence quenching

doi: 10.1360/972010-1451