

肌红蛋白与生物碱相互作用的光谱性质研究^①

杨媛^② 林琳 张伟 李永红

(郑州大学化学系分析化学专业 郑州市科学大道 100 号 450001)

摘 要 用分子荧光光谱法和紫外可见分光光度法研究了肌红蛋白(myoglobin, Mb)与咖啡因、茶碱相互作用的光谱性质变化。据 Stern-Volmer 图得到猝灭常数,由紫外-可见吸收光谱判断均为静态猝灭,通过热力学常数得出其相互作用力为静电作用,依据 Foerster 偶极-偶极无辐射能量转移理论计算出 Mb 与生物碱间的距离,并用同步荧光光谱技术考察了生物碱对 Mb 构象的影响。

关键词 肌红蛋白,生物碱,分子荧光光谱法。

中图分类号:O 657. 32

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2009)01-0122-04

1 前言

肌红蛋白(Mb)在生物体的肌肉中有运输和储藏氧的功能,在疾病诊断和临床医学中占有重要地位。咖啡因和茶碱结构相似,用于治疗神经衰弱和昏迷复苏,过量会导致精神失常、癫痫,以及呼吸、心脏骤停。本文在模拟生理条件下,采用荧光和紫外可见光谱研究了咖啡因、茶碱与Mb相互作用时的光谱性质变化。该法简单灵敏,以期为生物碱在生物体内作用研究提供有用数据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-3010 型荧光光度计(日本日立公司);Lambda 35 Perkin Elmer 紫外-可见分光光度计(日本日立公司)。

Mb(美国 Sigma 试剂公司)配制成 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,4℃冰箱中储藏;咖啡因和茶碱(上海生物化学试剂公司)均配制为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液; $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB(北京西中化工厂);pH=7.0 的磷酸盐缓冲溶液;所用试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

2.2 测定方法

在 10mL 比色管中依次加入 1mL Mb 溶液、2mL 缓冲溶液、2mL CTAB 溶液和适量的生物碱溶液,定容。于 15℃和 35℃下放置 15min,测定 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 230\text{nm}/310\text{nm}$ 条件下的荧光强度。固定激发波长和发射波长间距 $\Delta\lambda$ 为 55nm,记录 220—350nm 同步荧光光谱。激发和发射狭缝均为 5nm,扫描速度为 240nm/min。

① 河南省基础与前沿技术研究计划项目No. 072300420080

② 联系人,电话:(0371)67781024;Email: llylsium@163.com

作者简介:杨媛(1983—),女,河南省洛阳市人,硕士研究生,主要从事光化学分析工作。

收稿日期:2008-06-06;接受日期:2008-10-29

3 结果与讨论

3.1 Mb-CTAB-生物碱(咖啡因、茶碱)体系的荧光光谱

Mb 肽链中的色氨酸(T_{rp})、酪氨酸(T_{yr})和苯丙氨酸(Phe)残基能够吸收紫外光而产生荧光,但由于Mb呈紧密球形,内源荧光微弱。在表面活性剂存在下,Mb荧光强度增强,加入生物碱溶液后,Mb的荧光强度有规律的降低,且峰位置无变化。

3.2 猝灭机理的确定及猝灭常数的计算

荧光猝灭过程分为动态猝灭和静态猝灭^[1]。动态猝灭过程遵循 Stern-Volmer 方程: $F_0/F = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_{sv} \cdot [Q]$, 式中 K_{sv} 称为 Stern-Volmer 猝灭常数。静态猝灭过程可用下式描述: $F_0/F = 1 + K \cdot [Q]$, 式中: F_0 、 F —— 分别是未加入和加入猝灭剂时荧光物质的荧光强度; K_q —— 双分子猝灭过程的速率常数; τ_0 —— 没有猝灭剂存在下荧光分子的平均寿命; $[Q]$ —— 加入猝灭剂的浓度; K —— 基态配合物的形成常数。由两式可看出, 动态和静态猝灭过程中 F_0/F 与 $[Q]$ 均存在着线性关系。但动态猝灭温度升高将增大扩散系数, 增大双分子猝灭常数; 静态猝灭温度升高可能引起配合物的稳定性下降, 减小静态猝灭的程度。且动态猝灭只影响到荧光分子的激发态, 而静态猝灭中往往会导致荧光物质吸收光谱的改变。

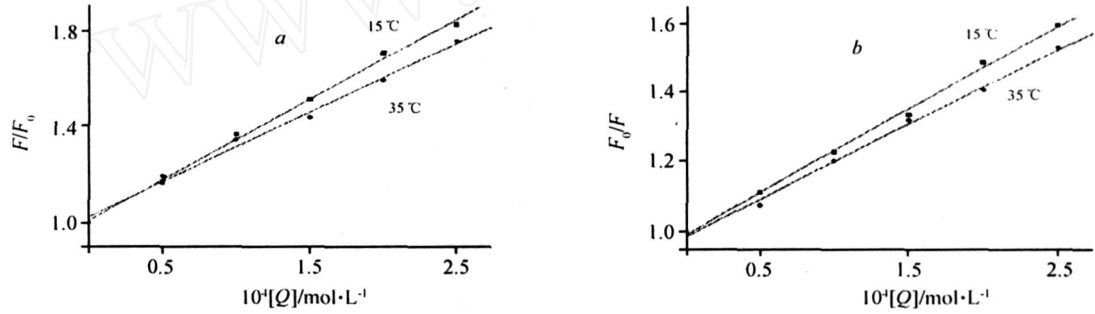


图 1 15℃和 30℃时咖啡因(a)、茶碱(b)分别与Mb作用的 Stern-Volmer 图

以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图, 得到生物碱的 Stern-Volmer 图。如图 1 所示, 咖啡因和茶碱的猝灭曲线均随温度的升高而降低, 猝灭过程为静态猝灭。根据斜率可以求出 K_{sv} , 结果见表 1。

表 1 生物碱与Mb相互作用的猝灭常数

生物碱	温度(℃)	$K_{sv}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	相关系数
咖啡因	15	3.3507×10^3	3.3507×10^{11}	0.998
	35	2.8823×10^3	2.8823×10^{11}	0.996
茶碱	15	2.4245×10^3	2.4245×10^{11}	0.998
	35	2.1661×10^3	2.1661×10^{11}	0.997

3.3 体系的紫外吸收光谱

测定了Mb的紫外吸收曲线及生物碱与Mb等摩尔混合物的紫外吸收曲线。结果这两条紫外吸收曲线的峰位、峰强和峰形都有明显差别, 表明咖啡因、茶碱的加入使Mb的吸收光谱发生变化, 进一步说明其猝灭机理为静态猝灭。

3.4 生物碱与Mb相互作用力的确定

生物大分子与小分子的作用力包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等, 根据热力学参数可简单判断作用类型^[2]。根据热力学公式计算生物碱与Mb作用的有关热力学参数, 见表 2。咖啡

因、茶碱均是 $\Delta_r H_m < 0$ 和 $\Delta_r S_m > 0$, 推断其与 Mb 间的作用力主要是静电作用。

表 2 生物碱与 Mb 体系作用的热力学参数

生物碱	$\Delta_r G_m$ (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta_r H_m$ (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta_r S_m$ (J · K ⁻¹ · mol ⁻¹)
咖啡因	- 19.44	- 5.55	48.23
茶碱	- 18.66	- 4.16	50.35

3.5 荧光给体-受体间距离的确定

表 3 生物碱与 Mb 作用的距离参数

生物碱	J (cm ³ /mol · L ⁻¹)	R_0 (nm)	E	r (nm)
咖啡因	2.39×10^{-14}	2.72	0.027	4.94
茶碱	3.09×10^{-14}	2.84	0.023	5.31

作两种生物碱的紫外吸收光谱与 Mb 的荧光光谱的重叠图, 根据 Forster 偶极-偶极无辐射能量转移理论^[3]可求得给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的光谱重叠积分 J 、给体与受体间能量转移效率 E 、临界能量转移距离 R_0 和生物碱与 Mb 作用的距离 r , 结果见表 3。如表 3 所示, $r < 7$ nm, 表明生物碱与 Mb 之间存在能量转移。

3.6 同步荧光光谱

选择 $\Delta\lambda = 55$ nm, 扫描 Mb 的同步荧光光谱。240 nm 处的峰为酪氨酸残基, 280 nm 处的峰为色氨酸残基。由图 2 可看出, 咖啡因和茶碱有导致 Mb 中的氨基酸残基荧光猝灭的作用。随着咖啡因、茶碱浓度的增加, 酪氨酸残基的峰位置不变, 而色氨酸残基的峰红移。

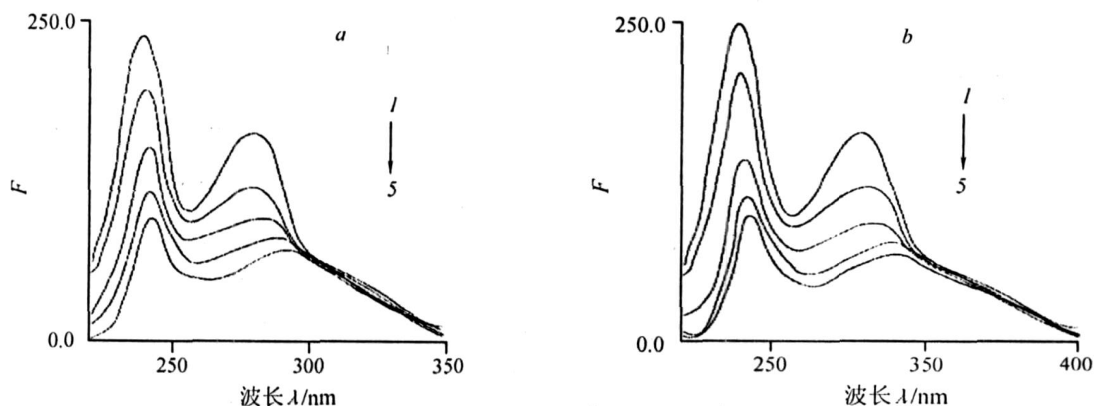


图 2 咖啡因(a)、茶碱(b)与 Mb 相互作用后的同步荧光光谱图

$C_{\text{咖啡因}} = C_{\text{茶碱}} (\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 1—5: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0。

$C_{\text{Mb}}: 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, C_{\text{CTAB}}: 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 小结

综上所述, 本文研究了咖啡因和茶碱分别与 Mb 作用时的光谱变化, 结果表明这两种生物碱对 Mb 的猝灭机理均为静态荧光猝灭过程, 其主要作用力是静电作用, 同步荧光法验证 Mb 构象发生了变化。

参考文献

- [1] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 112
- [2] 杨频, 高飞. 生物无机化学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 495
- [3] Foerster T. Intermolecular Energy Transference and Fluorescence[J]. *Ann Phys*, 1948, 2: 55

Study on the Interaction between Myoglobin and Alkaloid by Fluorescence Spectroscopy

YANG Yuan L N L in ZHANG Wei L i Yong-Hong

(Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, P. R. China)

Abstract The interaction of Mb and alkaloid (caffeine, theophylline) was studied by fluorescence spectrometry and ultraviolet spectrophotometry. The quenching mechanism of Mb with alkaloid was suggested as static quenching in terms of Stern-Volmer curves, conjugation effort was mainly electrostatic interaction according to the calculation of thermodynamic parameters, and the distance between them was estimated smaller than 7nm by energy transfer theory. The binding feature of alkaloid to Mb was studied by the synchronous fluorescence spectrum.

Key words Myoglobin, Alkaloid, Fluorescence Spectrometry.

穷酸的西南联大与 3 位诺贝尔奖得主

西南联大的历史,前后不过 8 年半(1937 年 9 月至 1946 年 5 月)。当年的物质条件可够穷酸的:学生宿舍无一砖一瓦,全是夯黄土为墙,堆茅草为顶,窗户没有一块玻璃,仅有几根树枝聊以象征。绝大多数师生经常是食不果腹,衣不蔽体,不时还要在敌机轰炸下逃生。在校学生不超过 2000。可是当年的西南联大,在三不管的地方,坚守大学理想,主张“教授是大学的灵魂”,实行“不妄用一钱,不妄用一人”,教师为爱国而教,学生为救国而学,吃红薯干,点桐油灯,以苦为乐,励精图治,弦歌不辍。特别是,培养出 3 位诺贝尔奖得主——杨振宁和李政道,另一位则是朱棣文(其父朱汝瑾是联大助教,其姑朱汝华是教授——曾昭抡的得意门生)。西南联大堪称真正意义上的世界一流大学。

西南联大身后的三校(北大、清华和南开),当今在校学生总数当在 60000—70000 之间,相当于当年的 30 多倍,三校校园内高楼大厦林立,与当年西南联大的茅屋草舍相比,真是天壤之别。所耗费的资金当在西南联大的数百倍以上。三校的年寿,从 1950 年算起,已有 59 年,若从改革开放算起,亦有 30 年,为当年西南联大寿命的 4 倍至 5 倍。以人力、财力和时间来看,都是当年西南联大无法望其项背的。以如此优越的条件和实力,却又无 1 人获得诺贝尔奖,其故安在!?

清华大学 1 位教授在美国访问时发现,世界一流的哈佛大学大门,却是十分古旧简朴的:拱型的门洞是用红砖砌的,中间是铁制的大门,门框上面是三角形的尖顶。两边的围墙也是红砖砌的,中间是陈旧的铁制护栏。但是而今中国学校的大门,甭说大学,就是一所重点中学的校门,也比哈佛大学的壮观。在一些国人看来,似乎要成为世界一流大学、一流中学就在于校门以及办公大楼的气派和壮观!?

我国是世界最大的发展中国家(最大的穷国),美国是世界最大的发达国家(最大的富国)。这位清华大学教授还看到在这世界最大的富国中,名牌大学的办公大楼和办公家俱仍是简朴的:楼房大多是 3 层的,上个世纪的转盘电话和用过多年的木制家俱还在使用。而在这个世界最大的穷国中的某些名牌大学,转盘电话和古朴的木制家俱早已(淘汰)不见踪影!仿佛这些“过时”的东西,与名牌大学的“身份”太不相称了吧!。

清华大学前校长梅贻琦说过:“大学者,非谓有大楼之谓也,有大师之谓也。”靠浮华的“形象工程”能建成世界一流名牌大学吗?

(本刊摘编自《随笔》杂志 2008 年第 2 期何兆武《关于诺贝尔奖情节》一文等)