

维生素 B₁₂与牛血清白蛋白相互作用的 荧光法研究^①

樊艳华^a 冯锋^{②a,b} 陈泽忠^b 双少敏^a

^a 山西大学化学化工学院 太原市坞城路 92 号 030006)

^b (山西大同大学有机化学研究所 山西省大同大学御东校区有机化学研究所 037009)

摘要 用荧光光谱法和紫外吸收光谱法研究了生理条件下维生素 B₁₂与牛血清白蛋白之间的相互作用。结果表明, 维生素 B₁₂对牛血清白蛋白的荧光有猝灭作用, 其猝灭过程属于静态猝灭。通过计算得出维生素 B₁₂与牛血清白蛋白的结合常数及结合位点数。根据 Foerster 非辐射能量转移理论, 测得维生素 B₁₂与牛血清白蛋白的能量转移效率 $E = 0.1091$, 维生素 B₁₂与牛血清白蛋白的结合位置距离 212 位的色氨酸残基为 6.29nm。同时采用同步荧光光谱法研究了维生素 B₁₂对牛血清白蛋白构象的影响。

关键词 维生素 B₁₂; 牛血清白蛋白; 荧光光谱法

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)03-4331-05

1 引言

蛋白质是生物体内具有重要生理功能的大分子, 是药物发挥药效的重要载体和靶分子。血清白蛋白是血浆中含量最丰富的一种载体蛋白, 药物进入血浆后首先与血清白蛋白结合, 然后再被运送到身体各部位^[1]。目前运用荧光光谱法对血清白蛋白作为载体蛋白与药物相互作用的研究已有很多报道^[2,3]。

维生素 B₁₂(VB₁₂) 是一种含有金属离子的水溶性维生素, 参与体内多种代谢, 对人体和动物健康起着重要的作用。关于 VB₁₂对人体的生理作用机制已有研究^[4,5], 但是 VB₁₂与牛血清白蛋白的相互作用研究还未见有文献报道。本文利用荧光法研究 VB₁₂与牛血清白蛋白的相互作用, 并计算两者的结合常数、结合位点数以及供体和受体之间的距离等, 这对了解 VB₁₂在生物体内代谢过程与生物效应机理有实际意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-2500 型荧光分光光度计(日本日立公司); Lambda35 紫外-可见分光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司); AP-2500 型电子天平(美国 Ohaus 公司); pH-3S 精密酸度计(南京桑力电子设备厂); KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

PBS 缓冲溶液: 准确称取 0.21g KCl、8.00g NaCl、0.24g KH₂PO₄、1.44g Na₂HPO₄ 用二次蒸馏水溶解并定容至 1000mL 的容量瓶中, 浓度为 0.01mol/L, 滴加适量浓度为 0.1mol/L 稀盐酸调节

① 山西省自然科学基金(2009011015-1)

② 联系人, 电话: (0352) 7158992; E-mail: feng-feng64@263.net

作者简介: 樊艳华(1983—), 女, 山西省汾阳市人, 在读研究生, 主要从事光谱分析和生物传感器的研究工作。

收稿日期: 2010-12-06; 接受日期: 2010-12-23

pH 为 7.40, 超声 10min 后备用; 牛血清白蛋白 (BSA, 分子量约 65000) 溶液: 准确称取 0.065g BSA (美国 Sigma 公司), 用 PBS 缓冲溶液配制成 1.0×10^{-5} mol/L 的储备液, 在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下保存; 维生素 B₁₂ 标准液 (VB₁₂): 准确称取 0.135g VB₁₂ (上海蓝季科技发展有限公司, 批号 040615, 纯度 99.0%), 用 PBS 缓冲溶液溶解, 配制成 1.0×10^{-3} mol/L 储备液备用; 所用试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 BSA 的荧光光谱及 VB₁₂ 对 BSA 的猝灭光谱

在 10mL 比色管中加入 1mL 1.0×10^{-5} mol/L 的 BSA 溶液, 再向各比色管中加入不同浓度的 VB₁₂ 溶液, 最后用 PBS 缓冲液定容, 摇匀, 室温下静置 4h。固定激发波长 282nm, 激发狭缝 5nm, 发射狭缝 5nm, 扫描 300—500nm 范围内的荧光发射光谱。扫描完毕后, 将波长差 $\Delta\lambda$ 分别固定为 20nm 与 75nm, 扫描 BSA 的同步荧光光谱。

2.2.2 VB₁₂ 的紫外-可见光谱与 BSA 的荧光光谱

分别稀释 BSA 溶液和 VB₁₂ 溶液至浓度为 1.0×10^{-6} mol/L。BSA 溶液以 282nm 为激发波长, 测定 250—500nm 范围内的荧光光谱; VB₁₂ 溶液进行 250—500nm 范围的紫外-可见光谱扫描。计算二者的重叠积分, 求出能量转移效率和相互作用距离。

3 结果与讨论

3.1 VB₁₂ 与 BSA 的相互作用光谱图

蛋白质中由于色氨酸和酪氨酸的存在而使其具有内源荧光 (牛血清白蛋白 $\lambda_{\text{ex}} = 282\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340\text{nm}$)。图 1 为 VB₁₂ 溶液与 BSA 作用后 BSA 的荧光猝灭光谱图, 由图 1 可见随着 VB₁₂ 浓度的不断增大, BSA 的荧光强度有规律的降低, 说明 VB₁₂ 猝灭了 BSA 的荧光, 二者有较强的相互作用。并且 VB₁₂ 浓度越大猝灭作用越强。从图中也可以看出, 当 VB₁₂ 浓度增大时, 最大发射峰发生蓝移, 到浓度为 2.2×10^{-5} mol/L 时蓝移至 335nm, 这说明 VB₁₂ 的加入使得 BSA 的荧光团微环境及蛋白质分子构象发生了变化^[6]。

3.2 VB₁₂ 对 BSA 荧光猝灭机理的确定

引起 BSA 荧光猝灭的原因有动态猝灭和静态猝灭两种。动态猝灭过程遵循 Stern-Volmer 方程^[7]:

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

式中: F_0 ——不存在猝灭体时 BSA 的荧光强度; F ——存在猝灭体时 BSA 的荧光强度; K_q ——动态猝灭速率常数; τ_0 ——不存在猝灭体时荧光体的荧光寿命; $[Q]$ ——猝灭体的浓度; K_{sv} ——Stern-Volmer 猝灭常数。

静态猝灭过程可用下式描述:

$$F_0/F = 1 + K_s [Q] \quad (2)$$

式中: K_s ——静态猝灭常数 (即配合物的缔合常数)。

假设 VB₁₂ 对牛血清白蛋白荧光猝灭机理为动态猝灭, 以 F_0/F 对相应的 $[Q]$ 作图, 由图 2 可知, VB₁₂ 在浓度为 2.0×10^{-5} — 2.2×10^{-5} mol/L 范围内, VB₁₂ 浓度与相对荧光强度 F_0/F 呈线性关系,

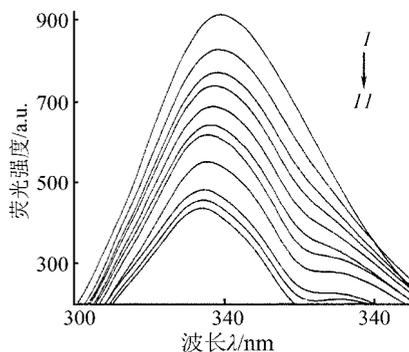


图 1 VB₁₂ 对 BSA 的荧光光谱的猝灭图 ($T = 293\text{K}$)

$C_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L; I—II $C_{\text{VB}_{12}} = 0, 2.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 1.0 \times 10^{-5}, 1.2 \times 10^{-5}, 1.6 \times 10^{-5}, 1.8 \times 10^{-5}, 2.0 \times 10^{-5}, 2.2 \times 10^{-5}$ mol/L。

线性方程为: $F_0/F = 0.9302 + 4.98 \times 10^4 [VB_{12}]$, 相关系数为 0.9989。由以上方程得斜率, 即猝灭常数 $K_{SV} = 4.98 \times 10^4 L/mol$, 由于生物分子的荧光寿命为 $10^{-8} s$, VB_{12} 对 BSA 猝灭速率常数 $K_q = 4.98 \times 10^{12} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, 远远大于各类猝灭剂对生物分子最大扩散碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ ^[8], 因此可以反证出 VB_{12} 对 BSA 的猝灭不是动态猝灭机制, 而是静态猝灭。

3.3 结合位点数 n 与结合常数 K_A 的确定

当小分子与大分子结合时其结合常数 K_A 与结合位点数 n 由下式求出^[9]。

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

式中: K_A —— 两种物质的结合常数。按上述公式作 $\lg(F_0 - F)/F - \lg[VB_{12}]$ 双对数曲线, 拟合后的结果见图 3。线性方程为 $\lg(F_0 - F)/F = 5.00 + 1.07 \lg[VB_{12}]$, 相关系数为 0.9964。由此得到, 斜率即 VB_{12} 与 BSA 的结合位点数 $n = 1.07$, 截距即结合常数 $K_A = 1.00 \times 10^5 L/mol$ 。

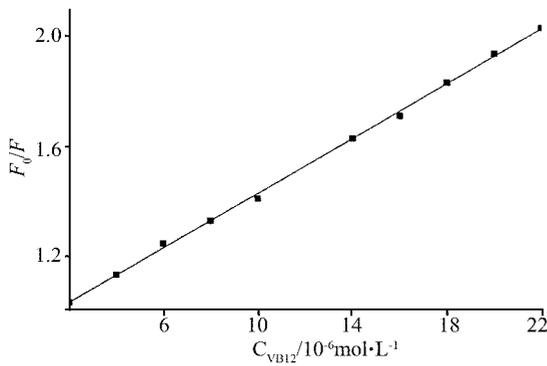


图 2 VB_{12} 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

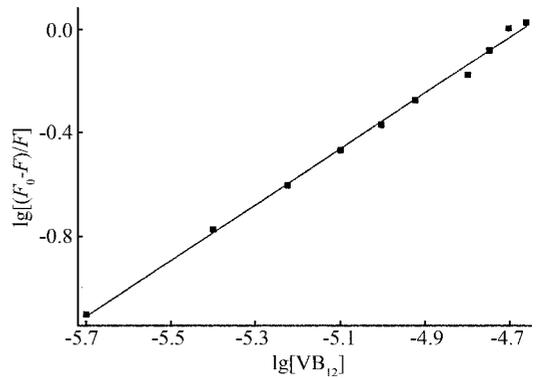


图 3 VB_{12} 对 BSA 的双对数图

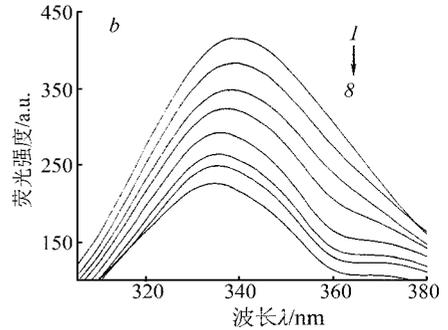
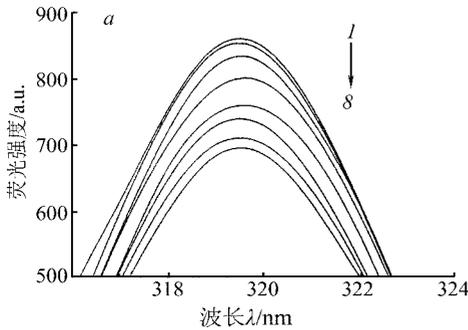


图 4 不同浓度的 VB_{12} 对 BSA 构象的影响

a —— $\Delta\lambda = 20nm$ (酪氨酸); b —— $\Delta\lambda = 75nm$ (色氨酸)。

$C_{BSA} = 1.0 \times 10^{-6} mol/L$; I —— 8 $C_{VB_{12}} = 0, 2.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 1.0 \times 10^{-5}, 1.2 \times 10^{-5}, 1.6 \times 10^{-5}, 1.8 \times 10^{-5} mol/L$ 。

3.4 同步荧光光谱研究 VB_{12} 对 BSA 构象的影响

蛋白质的内源荧光主要是由色氨酸和酪氨酸残基引起^[10]。加入 VB_{12} 使得 BSA 的内源荧光发生猝灭, 说明 BSA 的构象可能发生改变。同步荧光光谱是通过固定激发波长与发射波长间的间距, 扫描激发和发射单色皿得到^[11]。通过筛选, 在 $\Delta\lambda = 20, 75nm$ 为最佳波长差, 可以将蛋白质分子中的酪氨酸和色氨酸荧光峰分开, $\Delta\lambda = 20nm$ 时可以只得到酪氨酸残基荧光, $\Delta\lambda = 75nm$ 时是色氨酸残

基的荧光。因残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关,故可以通过发射波长的改变来判断蛋白质构象的变化。结果如图 4。固定 BSA 的浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时,酪氨酸残基和色氨酸残基的特征荧光光谱均随着 VB₁₂ 浓度的增加猝灭作用加强,但对色氨酸的猝灭程度比酪氨酸的要大。从图中还可看出,随着 VB₁₂ 用量的增大,酪氨酸残基的荧光峰的位置基本不变,而色氨酸残基的荧光峰位置稍有蓝移。一般认为氨基酸残基所处微环境的疏水性增强,则氨基酸残基的 λ_{max} 蓝移^[12]。由此可以判断 VB₁₂ 的加入没有改变酪氨酸残基所处微环境的极性,而色氨酸所在微环境的疏水性增强,BSA 的构象发生变化。也可由此推断 VB₁₂ 在 BSA 上的结合位置更接近于色氨酸。

3.5 VB₁₂与 BSA 间作用距离的求算

根据 Foerster 偶极-偶极非辐射能量转移理论,当供能体发射荧光,其荧光发射光谱与受能体的吸收光谱有足够程度的重叠,且供能体与受能体之间的最大距离不超过 7nm 时,将会发生非辐射能量转移^[13],导致荧光猝灭,由此可求出小分子化合物和蛋白质分子的结合位置相对于发射荧光的基团之间的距离。据此理论,非辐射能量转移效率 E 、供能体与受能体之间的结合距离 r 及临界能量转移距离 R_0 之间有下列关系:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) = 1 - F/F_0 \quad (4)$$

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

$$J = \frac{\sum F(\nu) \epsilon(\nu) \nu^{-4} \Delta\nu}{\sum F(\nu) \Delta\nu} \quad (6)$$

式中: K^2 ——偶极空间取向因子,一般取平均值 2/3; n ——介质折射常数,一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336; Φ ——BSA 的荧光量子产率,对于 BSA,通常取分子中色氨酸的量子产率 0.118; $F(\nu)$ ——荧光供能体在波数 ν 时的荧光强度; $\epsilon(\nu)$ ——受能体在波数 ν 时的摩尔吸收系数; J ——给能体荧光发射光谱与受能体吸收光谱的重叠积分^[14]。图 5 为 VB₁₂ 与 BSA 的摩尔比为 1:1 时的紫外-可见吸收光谱与荧光光谱的重叠图。

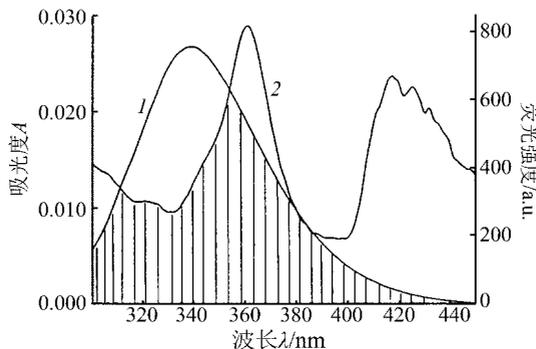


图 5 BSA 的荧光光谱(曲线 1)和 VB₁₂ 的吸收光谱
(曲线 2)

$$C_{\text{BSA}} = C_{\text{VB}_{12}} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}.$$

利用 Matlab 软件可以求出图 5 中两光谱重叠区域的积分值 J , $J = 2.7502 \times 10^{-21} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由公式(5)求得 $R_0^6 = 5.98 \times 10^{-26}$,再由公式(4)求出能量转移效率 $E = 0.1091$,进而求出 $r = 6.29 \text{ nm}$ ($r < 7 \text{ nm}$),符合能量转移理论,说明 VB₁₂ 与 BSA 是足够靠近,其结合是通过非辐射能量转移而促使蛋白质的荧光猝灭。BSA 分子中第 134 和 212 位处有两个色氨酸残基,他们分别处于不同的结构区域中,BSA 的荧光光谱主要由 212 位的色氨酸残基产生,因此可推知 VB₁₂

与 BSA 的结合位置距离 212 位的色氨酸残基为 6.29nm, 说明 VB₁₂ 与 BSA 之间发生了分子内非辐射能量转移。其结合通过非辐射能量转移而促使蛋白质的荧光猝灭。

4 结论

通过荧光光谱法研究了 VB₁₂ 和 BSA 的相互作用, 推导出 VB₁₂ 对 BSA 的荧光猝灭机制为静态猝灭。用同步荧光光谱法探讨了 VB₁₂ 对 BSA 构象的影响。根据非辐射的能量转移理论计算得出二者的相互作用距离。本文的研究对于阐明 VB₁₂ 的药物作用机制以及药代动力学等方面具有重要的参考价值。

参考文献

- [1] 陈泽忠, 冯锋, 杨文娟等. 左氧氟沙星与牛血清白蛋白相互作用的液滴荧光法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7): 1612—1616.
- [2] 史宏伟, 陈志兵, 曹稳根. 曙红 Y 与牛血清白蛋白相互作用机理[J]. 光谱实验室, 2009, 26(6): 1547—1551.
- [3] 周能, 梁逸曾, 刘韶. 甲基莲心碱与人血清白蛋白相互作用的研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(1): 49—54.
- [4] Hou H N, Qi Z D, OuYang Y W *et al.* Studies on Interaction Between Vitamin B₁₂ and Human Serum Albumin[J]. *J. Pharm Biomed Anal.*, 2008, 47(1): 134—139.
- [5] Hisaeda Y, Masuko T, Hanashima E *et al.* Organic/Inorganic Hybrid Nanomaterials with Vitamin B₁₂ Functions[J]. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2006, 7(7): 655—661.
- [6] 盛良全, 闫向阳, 徐华杰等. 烟碱与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(2): 306—308.
- [7] 陈国珍, 黄智贤, 郑朱梓等. 荧光分析法[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1990. 64—86.
- [8] 张海容, 郭祀远, 李琳等. 荧光法研究司帕沙星与白蛋白的作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(6): 829—832.
- [9] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of Protein Association reactions: Force Contributing to Stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096—3102.
- [10] 郭尧君. 荧光试验技术及其在分子生物学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1979. 134—155.
- [11] 刁海鹏, 王宁, 卞伟等. 光谱法研究硫唑嘌呤与人血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱实验室, 2008, 25(6): 1158—1162.
- [12] 王燕铭, 宋瑜, 孔德领等. 荧光法研究聚酰胺-胺型树枝状高分子及其衍生物与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 科学通报, 2005, 50(17): 1839—1844.
- [13] 孙绍发, 项光亚, 候汉娜等. 4-(4-羟基丁基-2-炔氧基)-3-(苯磺酰基)-1, 2, 5-噁二唑-2-氧化物与牛血清白蛋白结合作用的光谱法研究[J]. 中国化学, 2006, 24(8): 1050—1053.
- [14] 张晓星, 何苗, 刘爱林等. 荧光法对姜黄素与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(2): 395—401.

Studies on Interaction Between Bovine Serum Albumin and Vitamin B₁₂ by Fluorescence Spectrometry

FAN Yan-Hua^a FENG Feng^{a,b} CHEN Ze-Zhong^b SHUANG Shao-Min^a
^a(College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, P. R. China)
^b(Institute of Organic Chemistry, Shanxi Datong University, Datong, Shanxi 037009, P. R. China)

Abstract The interaction between vitamin B₁₂ (VB₁₂) and bovine serum albumin (BSA) was investigated by ultraviolet absorption spectrometry and fluorescence spectrometry. The results showed that the fluorescence of BSA was quenched by VB₁₂, which was the static quenching process. The binding constants (K_A) and the corresponding numbers of binding sites (n) were obtained by calculation. Based on the mechanism of the foerster energy transference, the transfer efficiency of energy (E) and distance (r) between VB₁₂ and BSA were 0.1091 and 6.29nm, respectively. The influence of VB₁₂ on conformational changes of BSA was investigated by synchronous spectrometry.

Key words Vitamin B₁₂; Bovine Serum Albumin; Fluorescence Spectrometry