

荧光光谱法研究黄芩苷与牛血清白蛋白的相互作用^①

尚永辉^② 孙家娟 刘静 李玉红

(咸阳师范学院化学与化工学院 陕西省咸阳市文林路中段 1 号 712000)

摘要 在 pH 为 7.40 的 Tris-HCl 缓冲体系中, 采用荧光光谱技术研究了黄芩苷与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。随着温度升高, 黄芩苷与牛血清白蛋白的猝灭常数逐渐增大, 表明黄芩苷对 BSA 的荧光猝灭为动态猝灭过程, 由结合过程的热力学参数 $\Delta H = 51.708 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} > 0$ 和 $\Delta S = 265.075 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} > 0$, 推断黄芩苷与 BSA 之间主要靠疏水作用力相结合, 生成自由能变(ΔG)为负值, 表明黄芩苷与 BSA 的作用过程是一个自发过程; 应用同步荧光光谱考察了黄芩苷对 BSA 构象的影响。

关键词 黄芩苷; 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)05-2367-03

1 引言

通过测定血清白蛋白的变化, 可为疾病诊断、疗效观察等提供有价值的资料及数据。荧光光谱法是目前研究蛋白质与药物分子相互作用的重要手段之一^[1]。黄芩苷(Baicalin)具有清热泻火、降压止咳等功效, 由于其疗效显著, 服用方便, 与多种抗生素间无交叉耐药性的特性, 临床上常用于治疗高血压、肺热咳嗽等疾病。实验在 pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲介质中采用荧光光谱技术研究了黄芩苷与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 并对其作用机理进行了初步分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

RF-5301 型荧光光度计(日本岛津公司); HA-180MF 电子分析天平(日本日立公司); TB-85 型恒温水浴槽(日本岛津公司); pHSJ-4A pH 计(上海雷磁仪器厂)。

牛血清白蛋白(美国 Amresco 公司, 纯度 > 98%, 分子量: 65000, BSA); 黄芩苷(标准品, 纯度 > 98%, 中国药品生物制品检定所); pH7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液; Tris、HCl 为分析纯。实验用水为双重蒸馏水。

以 Tris-HCl 缓冲溶液为溶剂分别配制浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 和黄芩苷的储备溶液, 两种储备溶液均存放于 0—4℃ 的冰箱中。实验所需浓度由此稀释而得。

2.2 实验方法

在 10mL 比色管中按序加入 pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液 2.0mL、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA

① 陕西省教育厅科研计划项目(2010JK899); 咸阳师范学院专项科研基金项目(10XSYK205)

② 联系人, 手机: (0) 15619562855; (029) 36896913; E-mail: shangyonghui@163.com

作者简介: 尚永辉(1978—), 男, 陕西省宝鸡市人, 讲师, 硕士, 主要从事药物分析研究工作。

收稿日期: 2010-11-17; 接受日期: 2010-12-31

溶液 0.1 mL 以及一定体积的黄芩苷储备溶液,用双重蒸馏水稀释至刻度,摇匀,在实验温度下恒温 1h,取适量于 1cm 石英比色皿中,以 285nm 为激发波长,分别绘制 300—500nm 区间的荧光发射光谱和 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$, $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ 的同步荧光光谱,测定中入射狭缝,出射狭缝宽度均为 3nm。

3 结果与讨论

3.1 荧光猝灭光谱

按照 2.2 方法分别测定 290、303、310、315K 温度下黄芩苷对 BSA 的荧光猝灭光谱(310K 的荧光光谱见图 1)。

由图 1 可知,随着黄芩苷浓度的增加 BSA 的荧光强度逐渐降低,这是由于 BSA 中的色氨酸和酪氨酸残基,使其具有一定的内源荧光,当 BSA 的量固定不变,逐渐增加黄芩苷的浓度时,黄芩苷与 BSA 之间的相互作用导致 BSA 的内源荧光强度有规律的猝灭。

3.2 荧光猝灭机理判断

引起 BSA 荧光猝灭的原因有动态猝灭和静态猝灭两种。两种猝灭过程均遵从 Stern-Volmer 方程^[2],随温度的升高动态猝灭常数增大,而静态猝灭常数减小,可由此判断荧光猝灭类型。不同温度下黄芩苷与 BSA 作用的 Stern-Volmer 方程及猝灭常数见表 1。

表 1 不同温度下黄芩苷对 BSA 的猝灭常数

T(K)	Stern-Volmer 方程	K_q ($\times 10^{13}\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
290	$F_0/F = 1.1839 \times 10^3 [Q] + 1.0150$	1.1839
303	$F_0/F = 1.2260 \times 10^3 [Q] + 0.9748$	1.2260
310	$F_0/F = 1.4227 \times 10^3 [Q] + 1.0165$	1.4227
315	$F_0/F = 1.4761 \times 10^3 [Q] + 0.9942$	1.4761

由表 1 可知:随温度升高猝灭常数(K_q)逐渐增加,推断黄芩苷对 BSA 的猝灭过程以动态猝灭为主。而各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数约为 $2 \times 10^{10}\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,从表 1 结果来看, K_q 大于该值,猝灭过程似乎应该为静态猝灭,考虑到离子强度是影响猝灭常数的重要因素,实验中采用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 以控制溶液离子强度,实验所得到的 K_q 的增大可能是离子强度影响的结果^[3],所以判断黄芩苷对 BSA 的荧光猝灭作用为动态猝灭过程。

3.3 牛血清白蛋白与黄芩苷结合反应的热力学性质及作用力

根据文献[3]的方法计算出实验温度下黄芩苷与 BSA 作用过程的热力学数据: $\Delta_r H_m = 51.708\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta_r G_m = -30.465\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (310K), $\Delta_r G_m = -31.791\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (315K), $\Delta_r S_m = 265.075\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 。由 $\Delta_r G_m < 0$ 可知,黄芩苷与 BSA 的相互作用是自发进行的;根据 Ross 等^[4]总结的判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律,结合过程 $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ 推断出黄芩苷与 BSA 结合过程是以疏水作用力为主。

3.4 黄芩苷与 BSA 的表观结合常数 K_b 以及结合位点数 n

当小分子与大分子结合时其表观结合常数 K_b 与结合位点数 n 由式(1)求出^[5]:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_b + n \lg [Q] \quad (1)$$

通过绘制实验温度下黄芩苷与 BSA 的 $\lg(F_0 - F)/F - \lg [Q]$ 的双对数图,根据截距和斜率分别求得相应的 K_b 和 n 见表 2。

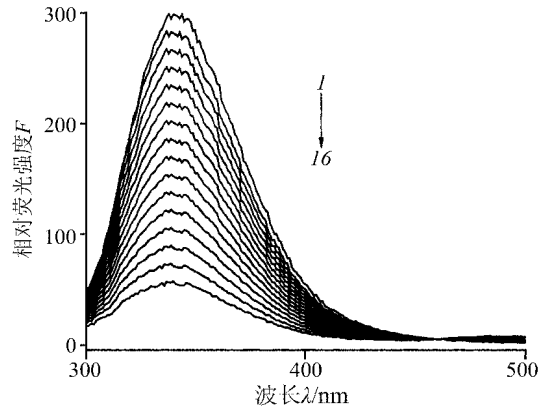


图 1 黄芩苷对 BSA 荧光光谱的影响($T = 310\text{K}$)
 $C_{\text{BSA}} = 0.1 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 曲线 1—16 的 $C_{\text{黄芩苷}} / \times 10^{-6}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0。

表 2 黄芩苷与 BSA 的表观结合常数 K_b 以及结合位点数 n

$T(K)$	线性方程	r	$K_b(L \cdot mol^{-1})$	n
290	$\lg[(F_0 - F)/F] = 0.9789 \lg[Q] + 4.9772$	0.9991	9.49×10^4	0.9789
303	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.0584 \lg[Q] + 5.3583$	0.9984	2.28×10^5	1.0548
310	$\lg[(F_0 - F)/F] = 0.9951 \lg[Q] + 5.1329$	0.9969	2.48×10^6	0.9951
315	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.0219 \lg[Q] + 5.2708$	0.9959	1.28×10^8	1.0219

由表 2 可知, 结合位点数 n 接近 1, 结合常数 K_b 值在 10^4 数量级以上, 表明黄芩苷与 BSA 具有一个结合位点, 且结合作用较强, 可以被蛋白质运输和储存。

3.5 同步荧光光谱

$\Delta\lambda = 15\text{nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 的同步荧光光谱分别显示酪氨酸残基和色氨酸残基的光谱特征, 实验发现酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光强度均随黄芩苷浓度的增加而逐渐降低, 色氨酸荧光发射波长无明显移动, 而酪氨酸残基的荧光发射波长发生了紫移, 表明黄芩苷对色氨酸残基微环境构象的改变不大, 而酪氨酸残基所处的微环境疏水性增加, 亲水性降低^[6]。

4 结论

根据测定 4 种不同温度下黄芩苷对 BSA 的荧光猝灭光谱, 研究了黄芩苷与 BSA 的相互作用; 实验发现黄芩苷对 BSA 的荧光猝灭过程为动态猝灭, 作用过程主要是靠疏水作用力相结合的自发过程, 同步荧光光谱表明黄芩苷对 BSA 中的色氨酸残基微环境构象的改变不大, 而对酪氨酸残基所处的微环境有一定影响。

参考文献

- [1] 胡艳军, 刘义, 侯安新. 稀土杂多酸盐 $\text{EuHSiM}_{10}\text{W}_{20}\text{O}_{40} \cdot 25\text{H}_2\text{O}$ 与 BSA 相互作用的研究[J]. 化学学报, 2004, 62(16): 1519—1523.
- [2] Sun S F, Zhou B, Hou H N. Studies on the Interaction Between Oxaprozin-E and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Methods [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, 39(4—5): 197—200.
- [3] 林琳, 孙素颜, 穆雪等. 对磺胺基杯[4]芳烃与血红蛋白相互作用的光谱研究[J]. 分析科学学报, 2007, 23(7): 681—684.
- [4] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096—3102.
- [5] Lakowicz J R, Weber G. Quenching of Fluorescence by Oxygen. A Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules[J]. *Biochemistry*, 1973, 12(21): 4161—4170.
- [6] 杜秀莲, 李荣昌, 王夔. 用同步荧光光谱法研究铽(III)与脱铁运铁蛋白的作用[J]. 科学通报, 2001, 46(5): 394—396.

Interaction Between Baicalin and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectrometry

SHANG Yong-Hui SUN Jia-Juan LIU Jing LI Yu-Hong

(School of Chemistry & Chemical Engineering, Xianyang Normal University, Xianyang, Shaanxi 712000, P. R. China)

Abstract The interaction between baicalin and bovine serum albumin(BSA) in Tris-HCl buffer (pH 7.4) was studied by fluorescence spectrometry. The quenching constants at different temperatures were obtained, and the quenching constants increased with the increasing of temperature, which indicated that the interaction between baicalin and BSA was a dynamic quenching process. The thermodynamic parameters, enthalpy change (ΔH) and entropy change (ΔS), were calculated to be $51.708\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} > 0$, and $265.075\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} > 0$, respectively, which indicated that the interaction of baicalin with BSA was driven mainly by hydrophobic interaction. The process of binding was a spontaneous process in which Gibbs free energy change (ΔG) was negative. The effect of baicalin on the conformation of BSA was analyzed by synchronous fluorescence spectrometry.

Key words Baicalin; Bovine Serum Albumin; Fluorescence Spectrometry