

荧光光谱法研究虎杖苷与牛血清白蛋白的相互作用^①

尚永辉^{②a, b} 杨格格^a 胡文婷^a 杨婷^a 李进^a

^a(咸阳师范学院化学与化工学院 陕西省咸阳市文林路 712000)

^b(西北大学分析科学研究所 西安市 710069)

摘 要 在不同温度下, 采用荧光光谱, 紫外-可见吸收光谱研究了虎杖苷与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。虎杖苷对 BSA 的荧光有较强的猝灭作用。根据 292K 和 311K 时虎杖苷对 BSA 的荧光猝灭作用, 利用 Stern-Volmer 方程及双倒数方程处理实验数据, 表明虎杖苷对 BSA 的荧光猝灭作用属于动态猝灭过程, 根据 Foerster 非辐射能量转移理论计算出了虎杖苷与 BSA 间的结合距离 $r = 3.61 \text{ nm}$, 结合常数(K_b)分别为 $5.189 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (292K), $1.382 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (311K) 及对应温度下的热力学参数。实验结果表明二者主要靠疏水作用力结合, 采用同步荧光光谱探讨了虎杖苷对 BSA 构象的影响。

关键词 虎杖苷; 牛血清白蛋白; 荧光光谱

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2010)04-4273-04

1 引言

血清白蛋白是人和动物血清中含量最丰富的一种蛋白质, 与各种带正负电荷的物质及电中性物质均有一定程度的相互作用^[1]。各种药物进入体内首先与血清白蛋白结合, 通过血浆的存储和运输, 到达受体部位产生药理作用。从不同角度研究以白蛋白为代表的蛋白质与具有生物活性小分子间的相互作用来了解药物的作用机制, 已成为目前的研究热点之一。实验运用荧光光谱技术在 $\text{pH} = 7.40$ 的 Tris-HCl 缓冲介质中研究了虎杖苷与牛血清白蛋白的相互作用, 并对其作用机理进行了初步分析。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

RF-5301 型荧光分光光度计(日本岛津公司); UV-8453 紫外分光光度计(日本日立公司); 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 实验室 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

牛血清白蛋白(Amresco, 0930, 分子量: 65000); 虎杖苷(中国药品生物制品检定所); $\text{pH} 7.40$ 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 缓冲溶液为溶剂配制 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 标准溶液, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

① 国家自然科学基金(20975081); 西北大学研究生交叉学科资助项目(07YJC09); 咸阳师范学院专项科研基金项目(08XSYK218); 咸阳师范学院大学生科研训练计划项目(08059)

② 联系人, 电话: (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, 主要从事化学计量学研究工作。

收稿日期: 2009-10-12; 接受日期: 2009-11-28

虎杖苷标准溶液, 两种标准溶液均在 0—4℃ 的冰箱中保存。实验所需浓度由此稀释而得。

2.2 实验方法

在 10mL 比色管中依次加入 pH7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液 2mL、 1×10^{-3} mol/L BSA 溶液 0.1mL 以及一定量虎杖苷溶液, 用蒸馏水稀释至刻线后混匀, 在实验温度下恒温 1h 采用 1cm 石英比色皿, 以 285nm 为激发波长, 绘制 300—500nm 之前的荧光光谱及 $\Delta\lambda = 60$ nm 和 $\Delta\lambda = 15$ nm 的同步荧光光谱, 测定中入射狭缝, 出射狭缝宽度均为 5nm。

3 结果与讨论

3.1 荧光猝灭光谱

按照实验方法分别测定了在 292K 和 311K 条件下虎杖苷对牛血清白蛋白的荧光猝灭光谱(见图 1)。

由图可知随着虎杖苷浓度的增加, 牛血清白蛋白的荧光强度逐渐降低, 这是由于蛋白质中存在色氨酸和酪氨酸, 使其具有内源荧光, 当固定 BSA 的量, 不断增加虎杖苷的浓度时, 虎杖苷与 BSA 之间的相互作用导致 BSA 340nm 处的内源荧光强度有规律的降低。表明虎杖苷与牛血清白蛋白产生了某种相互作用。

3.2 荧光猝灭机理

引起 BSA 荧光猝灭的原因有动态猝灭和静态猝灭两种, 无论动态猝灭过程还是静态猝灭过程, 加入猝灭剂前后的荧光强度的比值 F_0/F 与猝灭剂的浓度 $[Q]$ 均呈线性关系^[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。

以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图, 得到在 292K, 311K 虎杖苷对 BSA 的 Stern-Volmer 方程分别为: $F_0/F = 0.2729 \times 10^5 [Q] + 0.9795$ (292K), $F_0/F = 0.5301 \times 10^5 [Q] + 1.0629$; 猝灭常数分别为 $2.729 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $5.301 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。随温度升高猝灭常数增大, 表明猝灭过程为动态猝灭, 而各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 在实验温度下 K_q 数量级均为 10^{12} , 考虑到实验体系为离子溶液, 离子强度是影响猝灭系数的重要因素, 我们认为 K_q 的增大可能是离子强度影响的结果^[3]。

动态猝灭只影响到荧光分子的激发态, 而并不改变荧光物质的吸收光谱; 静态猝灭中, 由于基态配合物的生成会导致荧光物质吸收光谱的改变。为进一步考察虎杖苷对 BSA 的荧光猝灭机理, 分别测定了 1.0×10^{-5} mol/L BSA (以去离子水为参比) 和虎杖苷与 BSA 等摩尔混合物 (以等量的虎杖苷溶液作参比) 的吸收光谱图, 两条吸收谱线几乎完全重合 (图略), 表明虎杖苷的加入并未使 BSA 的吸收光谱发生变化, 证明虎杖苷对 BSA 荧光猝灭为动态猝灭过程。

3.3 牛血清白蛋白与虎杖苷结合反应的热力学性质及作用类型判断

药物等有机小分子和蛋白质等生物大分子之间的结合力主要包括氢键, 范德华力, 静电引力, 疏水作用力等。根据 Ross 等^[4]总结出的判断生物大分子与小分子结合力性质和生物大分子自身结合力性质的热力学规律可以判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型。在温度变化不大时, 反应的焓变 ΔH 可以看作一个常数, 由热力学公式^[5]:

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H_m (1/T_1 - 1/T_2) / R$$

$$\Delta G_m = -RT \ln K$$

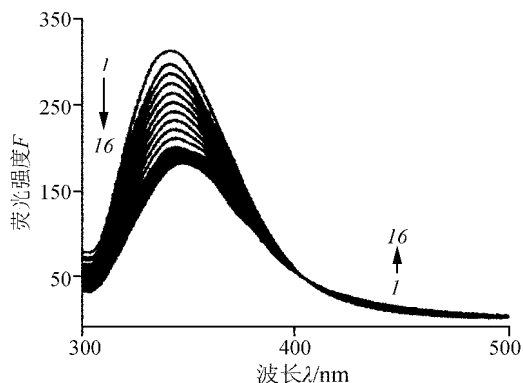


图 1 虎杖苷对牛血清白蛋白荧光的猝灭光谱 (292K)

$C_{\text{BSA}} = 0.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

1—16: $C_{\text{虎杖苷}} / 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} = 0, 0.2, 0.4, \dots, 2.8, 3.0$ 。

$$\Delta S_m = (\Delta H_m - \Delta G_m) / T$$

计算得到 $\Delta H_m = 26.387\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} > 0$ 和 $\Delta S_m = 0.1753\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} > 0$, 推断出虎杖苷与 BSA 之间的作用力以疏水作用力为主。

3.4 荧光给体-受体间距离的求取

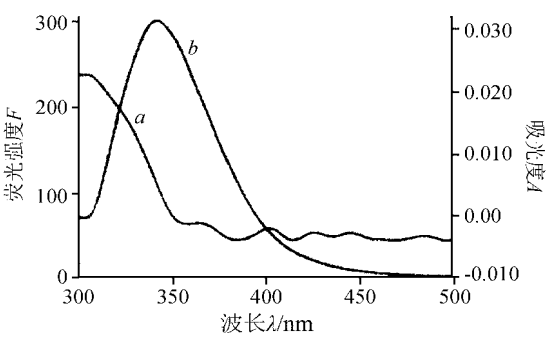
根据 Foerster 偶极-偶极非辐射能量转移理论, 非辐射能量转移效率 E , 供能体与受能体之间的结合距离 r 及临界能量转移距离 R_0 之间有下列关系:

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

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J$$

式中: F 和 F_0 ——为存在和不存在受能体时供能体的荧光发射强度; K^2 ——偶极空间取向因子; N ——介质折射常数; Φ ——BSA 的荧光量子产率。实验条件下, K^2 取受能体和供能体各项随机分布的平均值 $2/3$, Φ 取蛋白质中色氨酸的量子产率 0.15 , N 取水和有机物折射指数的平均值 $1.334^{[6]}$; J ——给体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分。

图 2 为虎杖苷与 BSA 的摩尔比为 1:1 时的吸收光谱与荧光光谱的重叠图, 求得重叠积分 $J = 4.120 \times 10^{-15} \text{cm}^3 / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $R_0 = 2.198 \text{nm}$, $E = 1 - (F/F_0) = 0.0487$ 。进而求出虎杖苷与蛋白质分子间的距离 $r = 3.61 \text{nm}$, 说明虎杖苷与 BSA 足够靠近($r < 7 \text{nm}$)^[7], 符合能量转移理论, 其结合是通过非辐射能量转移而促使蛋白质的荧光猝灭。



3.5 同步荧光光谱

图 3(a) 和图 3(b) 分别为 $\Delta\lambda = 15 \text{nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{nm}$ 的同步荧光光谱, $\Delta\lambda = 15 \text{nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{nm}$ 的同步荧光光谱分别只显示酪氨酸残基和色氨酸残基的光谱特征^[7]。由图可知酪氨酸残基和色氨酸残基的特征荧光峰均随虎杖苷浓度的增加而产生猝灭, 酪氨酸及色氨酸荧光峰的峰位置无明显变化, 表明虎杖苷分子的加入对蛋白质分子构象的改变不大。

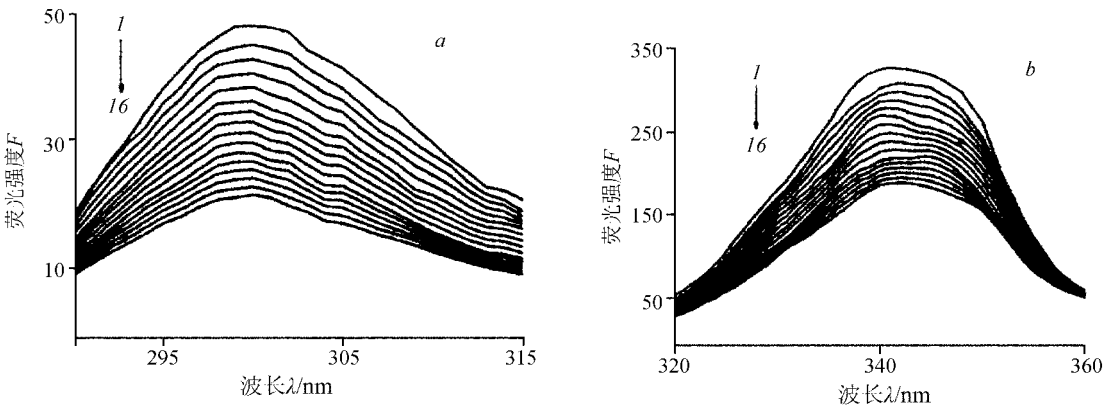


图 3 同步荧光光谱

a—— $\Delta\lambda = 15 \text{nm}$; b—— $\Delta\lambda = 60 \text{nm}$; $C_{\text{BSA}} = 0.1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1—16: $C_{\text{虎杖苷}} / 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} = 0, 0.2, 0.4, \dots, 2.8, 3.0$ 。

参考文献

- [1] 胡艳军, 刘义, 侯安新. 稀土杂多酸盐 $\text{EuHSiMo}_{10}\text{W}_2\text{O}_{40} \cdot 25\text{H}_2\text{O}$ 与 BSA 相互作用的研究[J]. 化学学报, 2004, **62**(16): 1519—1523.
- [2] 陈国珍, 黄贤智, 许金钧等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 502.
- [3] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 118, 122.
- [4] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability[J]. *Biochemistry*, 1981, **20**(11): 3096—3102.
- [5] Gonzalez-Jzmenoz J, Jacquotte H, Cayre I. Huorescence Quenching Studies on Binding Fluoreno-9-Spiro-Oxazolidinedione to Human Serum Albumin[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 1992, **84**(3): 221—228.
- [6] 杨曼曼, 杨频, 张立伟. 荧光法研究咖啡酸类药物与白蛋白的作用[J]. 科学通报, 1994, **39**(1): 31—35.
- [7] Sun S F, Xiang G Y, Hou H N *et al.* Studies on Interaction Between 4-(4-Hydroxybut-2-Ynyloxy)-3-(Phenylsulfonyl)-1,2,5-Oxadiazole-2-Oxide and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Method[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2006, **24**(8): 1050—1053.

Study on the Interaction of Bovine Serum Albumin with Polydatin by Fluorescence Spectroscopy

SHANG Yong-Hui^{a,b} YANG Ge-Ge^a HU Wen-Ting^a YANG Ting^a LI Jin^a

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

^a(Institute of Analytical Science, Northwest University, Xi'an 710069, P. R. China)

Abstract The binding reaction of polydatin with bovine serum albumin was studied at 292K and 311K by fluorescence and UV-Vis absorption spectroscopy. It was shown that polydatin has a strong ability of quenching the fluorescence of BSA. The Stern-Volmer curve and double logarithm equation of the fluorescence quenching of BSA by polydatin indicated that the quenching mechanism of polydatin to BSA was a dynamic quenching. According to the Foerster's theory of non-radiation energy transfer, the binding distances (r) was 3.61nm(292K), the binding constants (K_b) were $5.189 \times 10^5 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (292K), $1.382 \times 10^5 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (311K), respectively. The thermodynamic parameters showed that the interaction of polydatin and BSA was mainly driven by hydrophobic force. Synchronous spectrum was used to investigate the conformational changes of BSA.

Key words Polydatin; Bovine Serum Albumin (BSA); Fluorescence Spectroscopy

招聘启事

本刊招聘“沉潜专注 甘于寂寞”的编辑 2 名

因工作需要,本刊招聘编辑 2 名,条件如下:

1. 大学化学或物理学本科(包括同等学力,博士,硕士)毕业,成绩良好;
2. 身体健康,不吸烟,对人诚实、守信、和善;
3. 工作认真负责,任劳任怨,勤俭节约,热爱科学,沉潜专注,甘于寂寞;
4. 不限户口,性别,年龄,民族,党派,信仰等。

提供在北京市住宿,工资从优(面议),上 5 险。有意者,请将本人简历以及希望的工资报酬等要求发至《光谱实验室》编辑部电子邮箱: gpsys@263.net。

《光谱实验室》编辑部