

荧光光谱法研究 2, 4-滴丙酸及其手性对映体与牛血清白蛋白的相互作用

叶荣民^a 郭 赟

(浙江大学环境科学研究所 杭州市 310029)

^a(浙江省舟山海洋生态环境监测站 浙江省舟山市定海文化路 17 号 316004)

摘 要 用荧光光谱法研究了手性除草剂 2, 4-滴丙酸及其两种手性异构体分别与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。结果表明: 2, 4-滴丙酸对 BSA 的荧光有较强的猝灭作用, 且属于静态猝灭。实验获得了不同温度下 2, 4-滴丙酸及其对映体与牛血清白蛋白作用的结合常数, 发现相同温度下 *S* 型 2, 4-滴丙酸比 *R* 型更易与 BSA 结合, 其外消旋体的结合能力居于两者之间。通过计算反应热力学参数, 推测它们之间的主要作用力为疏水作用力。同步荧光光谱法研究 2, 4-滴丙酸对 BSA 构象的影响, 表明 2, 4-滴丙酸与 BSA 的结合位点位于色氨酸残基附近。

关键词 2, 4-滴丙酸; 对映异构体; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 相互作用

中图分类号: O 657. 32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2009)03-0586-05

1 前言

2, 4-滴丙酸(2, 4-二氯苯氧丙酸, Dichloroprop, DCP)属于手性苯氧丙酸类除草剂, 在农业中大量使用。DCPP 含有一个手性中心(结构见图 1), 其中 *R* 异构体具有除草活性, *S* 异构体的活性比较小。DCPP 可通过皮肤和呼吸系统进入人体, 对人体的各个器官产生损害, 具有潜在的致癌性和致突变性^[1]。因此, 研究 DCP 各个对映体在人体内的行为具有重要意义。

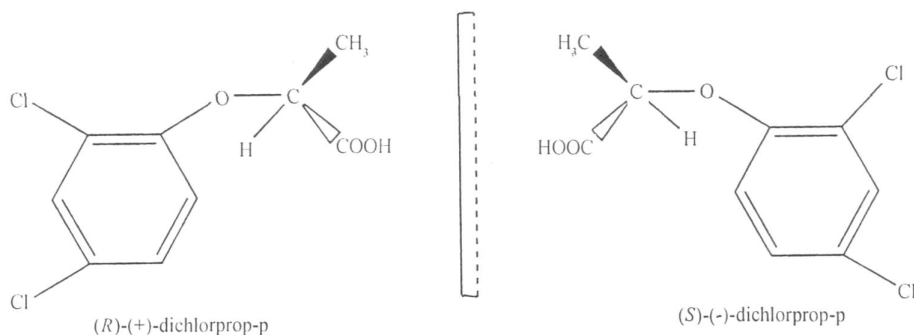


图 1 手性芳氧丙酸类除草剂 2, 4-滴丙酸的对映体结构

血清白蛋白在结合和运输内源性和外源性化合物中扮演重要角色, 有关小分子底物与其相互作用的研究十分活跃。目前这方面研究主要集中在药物及一些有机小分子污染物与血清白蛋白的

联系人, 电话: (0580) 2029131; E-mail: yerongnin@yahoo.cn

作者简介: 叶荣民(1983—), 男, 浙江省义乌市人, 硕士研究生, 主要研究方向: 环境分析化学。

收稿日期: 2008-11-06; 接受日期: 2008-11-24

相互作用^[2,3], 而农药, 尤其是手性农药各对映体与血清白蛋白的相互作用及它们之间的差异研究较少^[4]。本文模拟血清白蛋白的生理条件, 采用荧光光谱法研究DCPP与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 首次比较了DCPP不同手性异构体及外消旋体之间与BSA结合能力的差异, 获得它们间的结合常数、结合热力学常数及结合位置等信息, 并探讨了它们之间相互作用的机制, 为深入研究DCPP在体内的转运及毒性机理提供重要的依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LS-55 荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司); MP220 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司), SC-15 数控恒温槽(宁波天恒仪器厂), 优普超纯水机(上海优普实业)。

牛血清白蛋白(国药集团化学试剂有限公司, BR), 用超纯水配制成 $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的标准使用液。DCCP 及其 S 型、R 型异构体由实验室合成, 纯度 > 99%, 结构经过质谱和核磁共振验证, 分别用超纯水配置 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 标准使用液。缓冲液为 Tris-HCl 溶液(pH = 7.40)。其余试剂均为分析纯或生化试剂, 实验用水为超纯水。

2.2 实验方法

以 0.02 mol/L Tris-HCl 为缓冲溶液, 配制一系列 pH = 7.40, 含 0.1 mol/L NaCl $2.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ BSA 以及不同浓度 S-、R-或 Rac-DCCP 的溶液, 置于 1cm 石英比色池中, 固定激发波长为 277nm, 激发狭缝宽 15nm, 发射狭缝宽 10nm, 扫描速度 1000nm/min, 扫描体系在 300—440nm 范围内的发射光谱, 测定温度为 15、25 和 35℃。固定发射波长与激发波长差 $\Delta\lambda$ 分别为 20 和 60nm, 记录同步荧光光谱。

3 结果与讨论

3.1 荧光猝灭光谱

在 277nm 激发波长下, DCPP 及其对映体没有荧光发射, BSA 的最大发射波长为 351nm。实验研究了 15、25、35℃ 三个不同温度下 DCPP 及其对映体对 BSA 荧光的猝灭作用(图 2)。从图中可以看出, 在固定 BSA 浓度的条件下, 随着 DCPP 浓度的增加, BSA 的荧光产生了规律性的猝灭, 且有微弱的蓝移。蛋白质荧光的变化在一定程度上反映了蛋白质分子中荧光发色团本身及周围环境的变化, 说明 DCPP 与 BSA 发生了相互作用。这种作用可能引起 BSA 中荧光发色团的微环境及蛋白质分子构象行为的变化。

3.2 猝灭机理分析及结合常数确定

荧光猝灭作用因猝灭机制不同可分为动态猝灭、静态猝灭。若 DCPP 与 BSA 之间是动态猝灭作用, 可用 Stern-Volmer 方程^[5]进行描述:

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

其中: F_0 与 F ——分别为猝灭剂加入之前和加入之后体系的荧光强度; K_q ——双分子猝灭过程的速率常数; K_{sv} ——动态猝灭常数; $[Q]$ ——猝灭剂浓度; τ_0 ——没有猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命, 对于生物大分子, $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$ ^[6]。

若此过程为静态猝灭, 荧光强度与猝灭剂浓度的关系符合 Lineweaver-Burk 双倒数方程^[7]:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = 1 + \frac{1}{K_A [Q]} \quad (2)$$

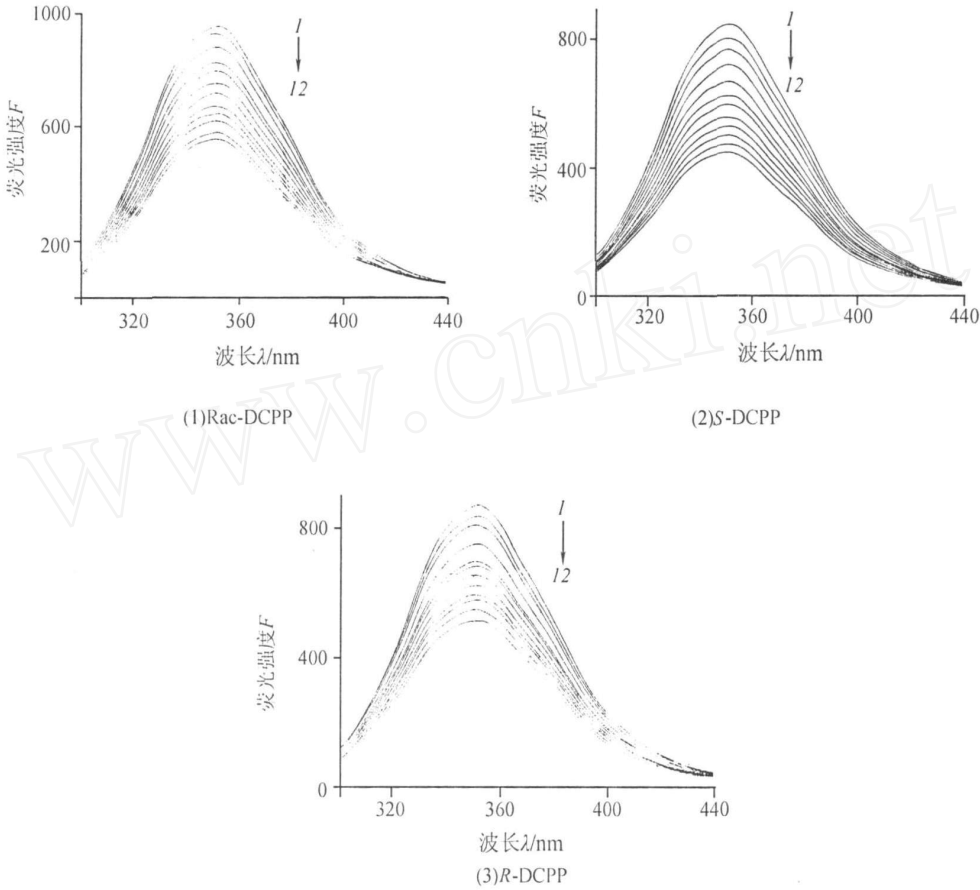


图 2 DCPD 对 BSA 荧光光谱的影响

1—12——CDPD ($\times 10^{-4}$ mol/L): 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0.

F_0 , F 和 $[Q]$ 意义同上, K_A ——结合常数。

根据不同温度下蛋白质荧光猝灭光谱, 拟合 Stern-Volmer 和 Lineweaver-Burk 方程, 得出各自的 K_{sv} , K_q 和 K_A 值列于表 1。

表 1 不同温度下 DCPD 与 BSA 的相互作用常数

$t(^{\circ}\text{C})$		K_{sv} (L/mol)	K_q (L/(mol·s))	r (Stern-Volmer)	K_A (L/mol)	r (Lineweaver-Burk)
Rac-DCPD	15	5.95×10^3	5.95×10^{11}	0.998	6.04×10^3	0.998
	25	6.58×10^3	6.58×10^{11}	0.995	6.29×10^3	0.995
	35	6.62×10^3	6.62×10^{11}	0.992	6.41×10^3	0.992
R-DCPD	15	5.29×10^3	5.29×10^{11}	0.997	5.37×10^3	0.997
	25	5.35×10^3	5.35×10^{11}	0.998	5.73×10^3	0.998
	35	5.62×10^3	5.62×10^{11}	0.999	6.04×10^3	0.999
S-DCPD	15	6.70×10^3	6.70×10^{11}	0.997	7.76×10^3	0.997
	25	7.19×10^3	7.19×10^{11}	0.999	8.14×10^3	0.999
	35	7.41×10^3	7.41×10^{11}	0.995	8.42×10^3	0.995

由于动态猝灭中各类猝灭剂对荧光分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2 \times 10^{10} \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})^{[8]}$, 而 DCPD 各对映体对 BSA 猝灭过程的 K_q 远大于最大扩散碰撞猝灭常数, 表明 DCPD 对 BSA 的荧光猝灭不是由于动态碰撞所引起, 而是由于形成了复合物而引起的静态猝灭^[6]。表 1 中数据表明, DCPD 和血清白蛋白的结合常数较大, 说明 DCPD 可以由血清白蛋白携带着在体内进行转运、贮存。

和分配。

3.3 DCPD 对映体差异性

手性物质的各对映体在空间结构上存在差异, 当它们与其他手性物质结合时, 相互间的空间位阻不同, 因而结合能力也有所不同。由于 BSA 本身具有丰富的手性结构, 使得 DCPD 两种对映单体与之结合时表现出一定的选择性。从表 1 可看出, 相同温度下 DCPD 及其对映体结合常数顺序为: $S\text{-DCPD} > \text{Rac-DCPD} > R\text{-DCPD}$, 说明 S 型异构体比 R 型更易与 BSA 结合, 通过其在体内的转运和分配, 可能会对哺乳动物和人产生更大的危害。

现在农业生产中使用的都是 2, 4-滴丙酸的外消旋体, 而 R 型异构体是其中的活性成分。如果提高农药中 R 型异构体的含量, 不仅可以提高除草效率, 减少农药的使用量, 而且会降低对生物体的危害, 产生更大的环境生态效益。

3.4 作用力类型判断

荧光猝灭剂与蛋白质的作用力类型主要包括氢键、范德华力、静电引力和疏水作用^[9]。Ross 等^[10]根据大量的实验结果, 总结出了判断小分子与生物大分子之间结合作用力性质的热力学规律: 疏水作用对体系的 ΔH 和 ΔS 产生正的贡献; 氢键或者范德华力则使 ΔH 和 ΔS 变负; 静电作用力时 $\Delta H \approx 0$, $\Delta S > 0$ 。因此可以根据反应前后热力学焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小, 来判断小分子与蛋白质之间的主要作用力类型。

当温度相差不大时, 反应焓变 (ΔH) 可视为常数, 由不同温度下的结合常数 K_A , 根据下列方程计算出反应焓变 ΔH 、熵变 ΔS 和吉布斯自由能变 ΔG ^[11], 所得结果列于表 2。

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H (1/T_1 - 1/T_2) / R \quad (3)$$

$$\ln K = - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (5)$$

表 2 DCPD 与 BSA 结合作用的热力学常数

	$t(^{\circ}\text{C})$	$\Delta G(\text{kJ/mol})$	$\Delta H(\text{kJ/mol})$	$\Delta S(\text{J/mol K})$
Rac-DCPD	15	- 20.86		82.31
	25	- 21.68	2.86	82.31
	35	- 22.46		82.16
$R\text{-DCPD}$	15	- 20.58		87.49
	25	- 21.45	4.64	87.49
	35	- 22.30		87.42
$S\text{-DCPD}$	15	- 21.46		86.28
	25	- 22.32	3.40	86.28
	35	- 23.16		86.19

$\Delta G < 0$, 表明 DCPD 及其对映体与 BSA 发生了结合作用, 且为一自发作用过程; 焓变 $\Delta H > 0$, 熵变 $\Delta S > 0$, 表明 DCPD 及其对映体与 BSA 的结合主要为疏水作用。

3.5 同步荧光光谱

蛋白质中的氨基酸残基的最大发射波长与它所处的环境的极性有关, 用同步荧光光谱可判断蛋白质的构象变化^[12]。血清白蛋白的内源性荧光主要源于色氨酸、酪氨酸等氨基酸。由 $\Delta\lambda = 20\text{nm}$ 所得的同步荧光光谱只显示酪氨酸残基的光谱特性, 而 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 所得的同步荧光光谱只显示色氨酸残基的光谱特性^[13]。

图 3(a) 和 (b) 分别为 BSA 中酪氨酸和色氨酸残基的荧光谱, 随着 DCPD 浓度的增加, 色氨酸残基荧光峰发生蓝移, 表明色氨酸残基所处的环境极性减小, 疏水性增强; 而酪氨酸残基荧光峰发生红移, 说明酪氨酸残基所处的环境极性增大^[14]。色氨酸残基的荧光强度下降比酪氨酸更明显, 说明结合位点更接近于色氨酸残基。

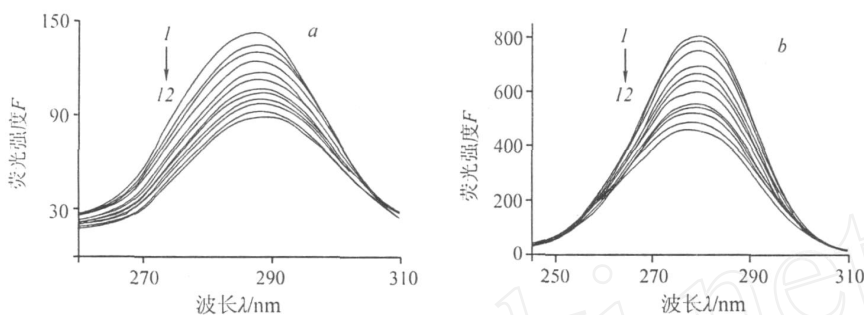


图 3 DCP 对牛血清白蛋白同步荧光的影响

a— $\Delta\lambda=20\text{nm}$; b— $\Delta\lambda=60\text{nm}$.

1—12— $C_{\text{DCP}}(\times 10^{-4}\text{mol/L})$: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0.

参考文献

- [1] Purcell M, Neault J F, Mabunga H *et al*. Interactions of Atrazine and 2, 4-D with Human Serum Albumin Studied by Gel and Capillary Electrophoresis, and FT IR Spectroscopy[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2001, **1548**(1): 129—138.
- [2] 马康, 陈晓青, 陈景文. 荧光光谱法研究三种黄酮类化合物与BSA 的相互作用[J]. *光谱实验室*, 2008, **25**(4): 662—668.
- [3] 于兵川, 吴洪特, 周培疆等. 五氯酚对牛血清白蛋白的荧光猝灭作用[J]. *环境科学*, 2006, **27**(5): 977—980.
- [4] 吴汉东, 史雪岩, 梁沛. 顺式氰戊菊酯与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. *光谱实验室*, 2008, **25**(4): 694—699.
- [5] Eftink M R, Ghiron C A. Fluorescence Quenching Studies with Proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, **114**(2): 199—227.
- [6] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*[M]. New York: Plenum Press, 1983.
- [7] 杨曼曼, 杨频. 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.
- [8] Ware W R. Oxygen Quenching of Fluorescence in Solution: An Experimental Study of the Diffusion Process[J]. *J. Phys. Chem.*, 1962, **66**(3): 455—458.
- [9] Teale F W J, Weber G. Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids[J]. *Biochemistry*, 1957, **65**(3): 476—482.
- [10] 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.
- [11] Ross D P, Ubranians S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability[J]. *Biochemistry*, 1981, **20**(11): 3096—3101.
- [12] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Fluorescence and the Location of Tryptophan Residues in Protein Molecules[J]. *Photochem. Photobiol.*, 1973, **18**(4): 263—267.
- [13] 张立伟, 杨频, 王芳. 二价铜、锌离子对盐酸巴马亭与牛血清白蛋白结合反应光谱的影响研究[J]. *无机化学学报*, 1999, **15**(4): 545—548.
- [14] 赵锦. 药物与血清白蛋白的相互作用及蛋白质新分析方法的研究[D]. 河北: 河北农业大学, 2007.

Fluorescence Spectroscopic Study on the Interaction of the Enantiomers of Dichlorprop with BSA

YE Rong-Min^a GUO Yun

(Institute of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, P. R. China)

^a(Zhoushan Marine Eco-Environmental Monitoring Station in Zhejiang Province, Zhoushan, Zhejiang 316004, P. R. China)

Abstract The interactions between enantiomers of dichlorprop and bovine serum albumin were studied by fluorescence spectrometry. The fluorescence of BSA exhibited remarkable decrease upon addition of the dichlorprop, and the quenching mechanism shown to be a static quenching procedure. The binding constants and thermodynamic parameters of dichlorprop with BSA were obtained at different temperatures, indicating that *S*-isomer is easier to bind to BSA, and the hydrophobic interaction force plays a main role in the interaction between dichlorprop and BSA. Synchronous fluorescence indicated that the binding of dichlorprop to BSA is near tryptophan subunit.

Key words Dichlorprop; Enantiomers; Bovine Serum Albumin; Fluorescence Spectroscopy; Interaction