

麦塔喇红与蛋白质相互作用的光谱研究

石 燕, 叶反帝, 郑为完

南昌大学食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047

摘 要 运用紫外光谱法和荧光光谱法研究了有机染料麦塔喇红与牛血清白蛋白(以下简称 BSA) 的相互作用。紫外光谱法研究表明, 两者之间的结合符合 Scatchard 模型, 存在两类结合, 结合数分别为 8.4 和 11.1, 结合常数分别为 $1.1 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 和 $1.5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。同时通过麦塔喇红与牛血清白蛋白的荧光猝灭对两者的作用机理进行了初步探讨, 对蛋白质构象变化进行了分析。

主题词 麦塔喇红; 牛血清白蛋白; 相互作用; 光谱研究

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)07-1314-04

引 言

白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质, 在人体内起着重要的储存和运输的作用, 它可以与许多内源、外源化合物结合^[1, 2]。麦塔喇红(MR)是一种荧光较强的染料。在生理条件下可与蛋白质发生相互作用。本文运用紫外光谱法研究麦塔喇红与牛血清白蛋白的相互结合情况, 求出了结合数与结合常数。推导出结合模型, 并运用荧光光谱法对两者的作用机理进行初步探讨, 通过分析麦塔喇红对牛血清白蛋白的荧光猝灭以及同步荧光光谱, 探讨出了其构象变化情况。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

BSA 购自华美公司以 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 水溶液配制, MR 以水配制, 以上溶液均置于冰箱保存。所用其他试剂均为分析纯。实验中使用二次重蒸水。Hitachi F-3010 荧光分光光度计(日本日立), U-2000 紫外分光光度计, pH S-2C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

1.2 实验方法

在一系列 10 mL 比色管中, 分别加入 2.0 mL pH 7.0 Tris-HCl 缓冲溶液, 不同体积的 MR($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 溶液, BSA($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 溶液, 稀释至刻度, 摇匀。在 U-2000 紫外分光光度计上测定其吸收光谱, 在 Hitachi F-3010 荧光分光光度计上测定其荧光光谱(激发、发射狭缝均为 5 nm)。

2 结果与讨论

2.1 MR-BSA 的吸收光谱和荧光光谱

图 1 为 MR-BSA 的吸收光谱, MR 的最大吸收峰为 540 nm, 加入 BSA 后, 吸光度下降, 且吸收峰红移。随着 BSA 浓度逐渐增加, 吸收峰红移至 554 nm, 且吸光度又逐渐增大。图 2 为 MR-BSA 的荧光光谱, MR 的荧光峰为 556 nm, 当加入低浓度的 BSA 时, 荧光发生猝灭且荧光峰红移。红移

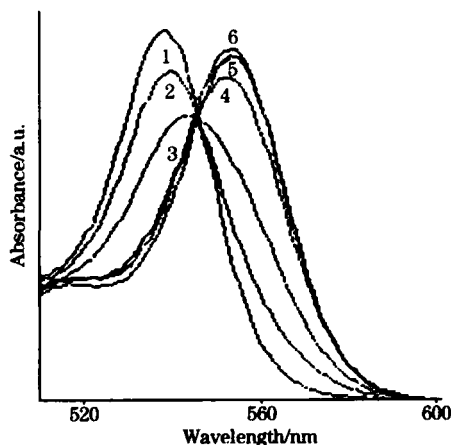


Fig 1 Absorption spectra of MR-BSA

$c_{\text{MR}}: 1.1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$c_{\text{BSA}} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 1: 0.0; 2: 7.5×10^{-7} ; 3: 1.5×10^{-6} ;
4: 2.2×10^{-6} ; 5: 3.0×10^{-6} ; 6: 6.0×10^{-6}

收稿日期: 2004-12-10, 修订日期: 2005-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(30460117)和南昌大学校科研基金(z02478)资助项目

作者简介: 石 燕, 女, 1964 年生, 南昌大学食品科学教育部重点实验室副教授, 博士研究生

至 572 nm 后, 随着 BSA 的浓度逐渐增大, 荧光强度增大, 荧光峰位置不变。

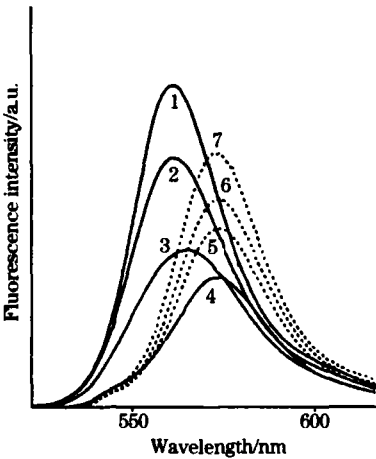


Fig 2 Fluorescence spectra of MR-BSA
 $c_{MR}: 1.1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 $c_{BSA}(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 1: 0.0; 2: 3.0×10^{-7} ; 3: 6.0×10^{-7} ; 4: 1.5×10^{-6} ; 5: 2.2×10^{-6} ; 6: 3.0×10^{-6} ; 7: 6.0×10^{-6}

2.2 MR 与 BSA 相互结合的结合数和结合常数的求算(双波长法)

当 BSA 浓度较大时, 加入少量的 MR, 可以认为此时的 MR 都与 BSA 形成了复合物^[3]。同时, 由于 BSA 在可见光区无吸收, 因此, 此时的吸收光谱就可以认为是复合物 MR-BSA 的吸收光谱, 在此吸收光谱上选择 MR-BSA 的两个等吸收波长为 544, 563.6 nm, 见表 1。

Table 1 Equal absorption wavelength				
$V_{MR}(100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.05	0.1	0.2	0.3
$A_{\lambda_1}(\lambda_1 = 544 \text{ nm})$	0.047	0.073	0.135	0.196
$A_{\lambda_2}(\lambda_2 = 563.6 \text{ nm})$	0.047	0.073	0.134	0.193

根据文献[3]推导, 在等吸收波长处

$$\Delta A = (\epsilon_{\lambda_1} - \epsilon_{\lambda_2})[L] \tag{1}$$

ϵ_{λ_1} : 在波长 λ_1 处 MR 的摩尔吸光系数, ϵ_{λ_2} : 在波长 λ_2 处 MR 的摩尔吸光系数, $[L]$: 溶液中游离 MR 的浓度, ΔA : 在两个等吸收波长处测定体系的吸光度之差。

ΔA 只与溶液中游离 MR 的浓度有关, 作出 ΔA 与 $[L]$ 的双波长工作曲线, 可以直接求出溶液中游离 MR 的浓度 $[L]$, 若加入 MR 的浓度为 $[L]_0$, 那么每一分子 BSA 结合 MR 的数目可由下式求得

$$n = ([L]_0 - [L]) / c_{BSA} \tag{2}$$

pH 7.0 时, 在不同 MR 的浓度下, 测得的结合数 n 列于表 2。作 $n/[L] - n$ 图(见图 3), 可见 MR 与 BSA 结合符合 Scatchard 模型, 且有两类结合, 第一类结合数 n_1 为 8.4, 结合常数为 $1.1 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 第二类结合数 n_2 为 11.1, 结合常数为 $1.5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。

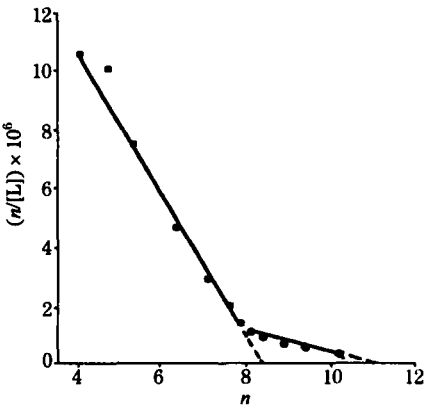


Fig 3 Scatchard curve of double wavelength
 $c_{BSA}: 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 MR 对 BSA 的荧光猝灭及 Stern-Volmer 图

图 4 为 MR 对 BSA 的荧光猝灭图, 随着 MR 浓度增大, BSA 的荧光发生猝灭, 荧光峰紫移。

荧光猝灭的原因很多, 但通常可以分为动态猝灭和静态猝灭^[4]。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态之间的相互作用过程。其作用过程遵循 Stern-Volmer 方程

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 c_Q = 1 + K_{sv} c_Q \tag{3}$$

式中: F_0 为未加入猝灭剂时荧光物质的荧光强度, K_q 为双分子猝灭过程的速率常数, τ_0 为没有猝灭剂存在下荧光分子的平均寿命, K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, c_Q 为猝灭剂浓度。

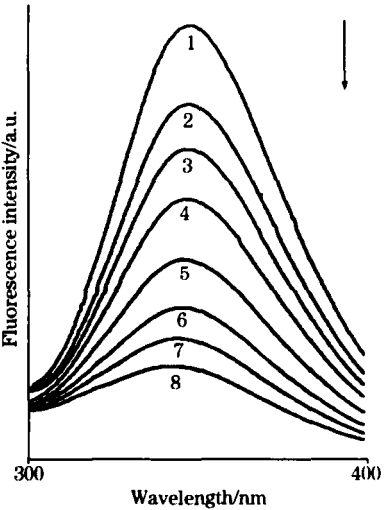


Fig 4 Effect of MR on fluorescence spectra of BSA
 $c_{BSA}: 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 $c_{MR}(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 1: 0.0; 2: 4.2×10^{-6} ; 3: 8.4×10^{-6} ; 4: 1.3×10^{-5} ; 5: 1.7×10^{-5} ; 6: 2.1×10^{-5} ; 7: 2.5×10^{-5} ; 8: 2.9×10^{-5}

静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物, 从而导致荧光物质荧光强度降低的过程。

Table 2 The binding numbers of BSA by MR at different concentration

$[L]_0 \times 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$[L] \times 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c_{\text{BSA}} \times 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	n
6.5	0.37	1.5	4.1
7.6	0.46		4.8
8.7	0.68		5.3
10.9	1.3		6.4
13.1	2.4		7.1
14.6	3.7		7.6
16.6	5.4		7.9
19.6	7.1		8.1
20.8	8.8		8.4
25.0	12.3		8.9
29.1	15.7		9.4
41.6	27.0		10.2

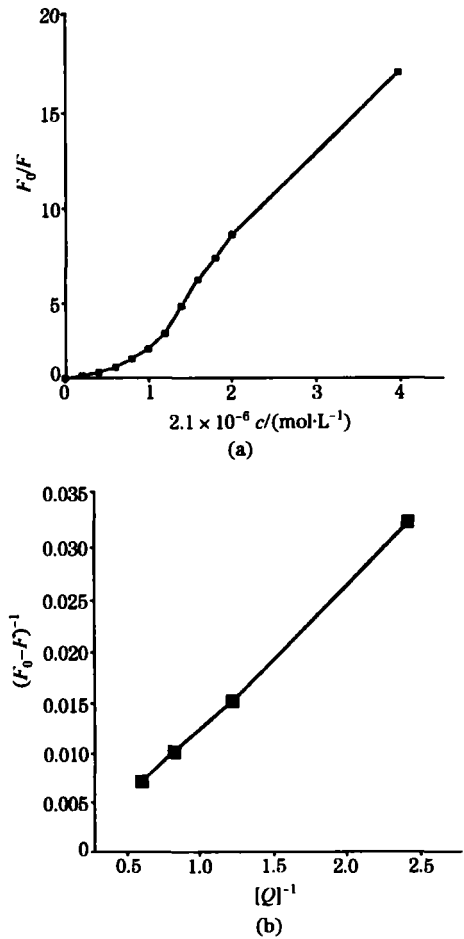


Fig 5 The Stern-Volmer curves (a) and Lineweaver-Burk curves (b)

其

$$F_0/F = 1 + Kc_Q \tag{4}$$

式中 K 是基态配合物的形成常数。

根据式(3)，(4)式作 MR 对 BSA 的荧光猝灭的 Stern-Volmer 图[图 5(a)]，在低浓度区呈直线，而在高浓度则呈上升曲线。这说明在低浓度是静态猝灭而在较高浓度已非单一静态猝灭。

由式

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D F_0^{-1} [Q]^{-1} \tag{5}$$

作低浓度的双倒数 Lineweaver-Burk 图^[5] [图 5(b)]，可由斜率和截距求得 MR 与 BSA 的解离常数 $K_D = 3.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；线性相关系数为 0.998， $[Q]^{-1}$ 为猝灭剂浓度的倒数。

2.4 MR 对 BSA 构象的影响

蛋白质的构象变化可以通过蛋白质固定波长的同步荧光光谱的变化来判断^[6]，当 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时所表现出来的同步荧光光谱为蛋白质酪氨酸残基的光谱特征，而 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时，所显示的同步荧光光谱为蛋白质色氨酸残基的荧光。因残基所处的环境极性不同所表现出来的最大发射波长不一样，因此，根据最大发射波长改变则可判断蛋白质的构象变化。

固定 BSA 的量，逐渐增加 MR 的浓度，分别固定 $\Delta\lambda =$

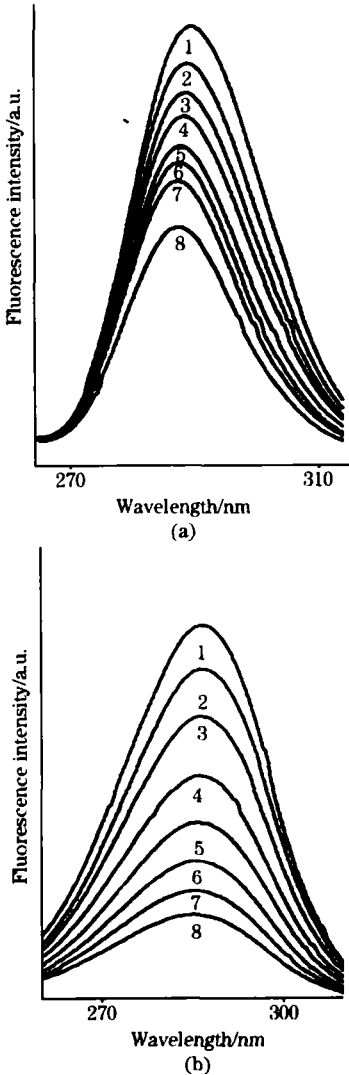


Fig 6 Effect of MR on synchronous fluorescence spectra of BSA

(a): $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; (b): $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

$c_{\text{BSA}}: 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{MR}} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1: 0.0; 2: 4.4×10^{-7} ; 3: 8.8×10^{-7} ; 4: 1.3×10^{-6} ; 5: 1.8×10^{-6} ; 6: 2.2×10^{-6} ; 7: 2.6×10^{-6} ; 8: 3.0×10^{-6}

15 nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm, 得到 BSA 中酪氨酸残基的同步荧光光谱[见图 6(a)] 和色氨酸残基的同步荧光光谱[见图 6(b)], 随着 MR 的浓度逐渐增加, 酪氨酸的荧光发射波长紫移, 而色氨酸荧光发射波长则不受影响。

2.5 讨论

MR 和 BSA 之间的紫外光谱表明, 在低浓度时, MR 与 BSA 之间形成了一种配合物, 使得 MR 的吸收光谱红移。同时表现在低浓度时 MR 的荧光发生猝灭, 而且荧光峰红移。MR 对 BSA 的荧光影响也证实了 MR 与 BSA 之间形成了一种配合物。使得在低浓度时荧光产生静态猝灭。利用双波长法求出了 MR 和 BSA 结合的结合数和结合常数。表明两者的结合是与 BSA 的特定区域的结合, 符合 Scatchard 模型。

根据 MR 对 BSA 的荧光猝灭曲线观察到, 在低浓度区呈线性, 而在高浓度时则呈上升曲线, 这说明在低浓度时, 两者形成了一种配合物, 使得荧光产生静态猝灭。而在较高浓度时则非单一静态猝灭^[5]。这也表现在 BSA 对 MR 的荧

光光谱低浓度时发生猝灭, 而在较高浓度荧光峰红移, 荧光强度增大。这可能是随着 MR 浓度的增加, 引起了 BSA 构象变化。结合图 6(a) 和图 6(b) MR 对 BSA 同步荧光猝灭图, 我们发现, MR 的加入对色氨酸的荧光发射波长没有影响, 但随着 MR 浓度的增加, 使得酪氨酸和 BSA 的荧光发射波长发生紫移。这说明 MR 与 BSA 的结合对 BSA 上色氨酸微区的构象没有影响, 而使酪氨酸微区的构象发生了变化。因此, 我们可以认为, 在整个结合过程中, MR 优先与色氨酸结合, 随着 MR 浓度的增加, MR 开始同酪氨酸微区结合, 而且使该微区 BSA 的构象发生了改变。表现出不仅使荧光光谱图发生紫移, 而且在高浓度时偏离静态猝灭。BSA 紫移较酪氨酸大, 这不但是由于蛋白质构象的影响, 还可能是由于随着 MR 的加入, BSA 上色氨酸微区荧光被猝灭及色氨酸、酪氨酸两残基间的能量传递受阻, BSA 中原来被掩盖的酪氨酸短波长的荧光逐渐显示出来。因此, 观察到较大的波长紫移。

参 考 文 献

- [1] Kragh-Hansen U. Pharmacological, Review, 1981, 33(1): 17.
- [2] LUO Zong-ming, ZHANG Kun, CUI Ying-de, et al(罗宗铭, 张 , 崔英德, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(2): 251.
- [3] ZHU Keng, TONG Shen-yang(朱 铿, 童沈阳). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1996, 54: 620.
- [4] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analysis(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [5] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨 频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [6] XIAO Hou-rong, SHENG Liang-quan, SHI Chun-hua, et al(肖厚荣, 盛良全, 施春华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 78.

Spectrometry Study on the Interaction of Magdala Red and Bovine Serum Albumin

SHI Yan, YE Fan-di, ZHENG Wei-wan

Key Laboratory of Food Science of MOE, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Abstract In the present paper, the interaction of Magdala red and bovine serum albumin(BSA) was studied by UV-absorption and fluorescence spectrometry. The results of UV-absorption spectrometry show that the way of the interaction of Magdala red and BSA should obey the Scatchard Model. In other words, Magdala should be combined to some certain regions of BSA. Meanwhile, taking advantage of fluorescence quenching, the reaction mechanism of Magdala with BSA was explored. Protein molecule conformation change is discussed by synchronous fluorescence spectrometry.

Keywords Magdala red; Bovine serum albumin, Interaction; Spectrometry study

(Received Dec. 10, 2004; accepted Mar. 28, 2005)