

## 酸度对氧氟沙星与牛血清白蛋白结合的影响

唐臻强<sup>1</sup>, 贺干武<sup>2</sup>, 易平贵<sup>1\*</sup>

1. 湖南科技大学化学化工学院, 分子构效关系湖南省高校重点实验室, 湖南 湘潭 411201  
2. 邵阳学院, 湖南 邵阳 422004

**摘要** 牛血清白蛋白在不同 pH 的溶液中存在 N(pH ~ 7.0), B(pH ~ 9.0) 和 E(pH 3.5 以下) 等几种同分异构形态。采用紫外-可见光谱和荧光光谱研究了酸度对牛血清白蛋白(BSA) 的结构以及对不同结构的 BSA 和氧氟沙星的相互作用的影响, 应用荧光猝灭现象和 Förster 理论, 求出了 4 个不同 pH 下两者结合的猝灭常数、能量转移效率和结合距离等参数。结果显示, 氧氟沙星与牛血清白蛋白在 pH 4.9 时结合常数最大( $1.9281 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), 结合距离小( $r = 2.55 \text{ nm}$ ), 猝灭效应最好( $8.63 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ); 氧氟沙星与牛血清白蛋白的结合过程中, 静态猝灭和非辐射能量转移是导致牛血清白蛋白荧光猝灭的原因; 中性、弱酸和弱碱性环境对两者的结合没有太大的影响, 静电作用不是两者相互作用的主要作用力。使用同步荧光技术考察了氧氟沙星对 BSA 构象的影响。

**关键词** 氧氟沙星; 牛血清白蛋白; 荧光猝灭; 同步荧光

**中图分类号**: O561.3; Q518.4 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)05-1107-04

### 引言

氧氟沙星(Ofloxacin)是当前广泛应用于临床的新一代含哌嗪基的喹诺酮类药物, 具有抗菌谱广、作用强和毒性较小的特点。这类药物通过抑制细菌的 DNA 旋转酶和拓扑异构酶, 抑制细菌 DNA 复制、转录和修复过程<sup>[1]</sup>。血清白蛋白是血液中含有最丰富的蛋白质, 具有许多重要的生理功能, 能和许多化学物质以不同方式结合, 并携带这些物质通过血液在体内进行转运、运输、分配和代谢。血清蛋白作为体外研究药物的结合和运输模型备受重视<sup>[2]</sup>。BSA 分子由一条单独的氨基酸多肽链构成, 其三级结构主要为  $\alpha$ -螺旋结构, 其中包含 3 个结构域, 即 Site 1, Site 2 和 Site 3。每个结构域包含 A 和 B 两个亚区, 以槽口相对的方式形成一种圆筒状结构。其中 Site 1 和 Site 2 两个结构域与许多小分子化合物具有较强结合能力<sup>[2,3]</sup>, 其结构随溶液 pH 的改变会发生改变: pH 5.0~3.5 发生 N-F 转变; pH 3.5~1.2 发生 F-E 转变; pH 7.0~9.0 发生 N-B 转变, 在其他变性剂如脲、胍等的作用下还会出现一种中间态<sup>[4-8]</sup>。各种不同的转变态伴随结构和构象改变, 与药物或染料等小分子的结合情况也会不同<sup>[9,10]</sup>。

### 1 实验部分

#### 1.1 试剂和仪器

牛血清白蛋白(含量大于 99%)购自上海华美生物工程有限公司, Ofloxacin 购自浙江海门制药厂, 醋酸、硼酸、磷酸、氯化钠、氢氧化钠等均为分析纯试剂, 实验用水系二次蒸馏水。BSA 以  $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.0 的三酸缓冲溶液(内含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 维持离子强度)配成一定浓度的溶液。Ofloxacin 先溶解在少量氢氧化钠溶液中, 用二次蒸馏水配成  $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。RF-5301 荧光分光光度计(日本岛津公司); UV-2501 型分光光度计(日本岛津公司); pH S-3 型酸度计(上海雷磁厂)。

#### 1.2 实验步骤

移取 1 mL Ofloxacin 储备液于 10 mL 具塞比色管中, 加入不同 pH 的三酸缓冲溶液至刻度, 摇匀静置 10 min 后, 用 1 cm 比色皿在 280~400 nm 进行紫外光谱扫描。室温下移取 2.0 mL BSA 储备液在 10 mL 具塞比色管中, 加入缓冲溶液至刻度, 摇匀静置 15 min 后, 用微量注射器逐次加入 Ofloxacin 溶液进行荧光滴定(滴定剂累加体积小于 200  $\mu\text{L}$ ), 荧光发射与激发狭缝宽度均为 5 nm, 扫描速度中等,  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ , 室温下绘制发射光谱。

收稿日期: 2006-12-11, 修订日期: 2007-03-16

基金项目: "973"项目(2003CB716000)和国家安全生产监督管理局科技项目(04-236)资助

作者简介: 唐臻强, 1972 年生, 湖南科技大学化学化工学院讲师 \*通讯联系人 e-mail: yipinggui@sohu.com

## 2 结果和讨论

### 2.1 Of1x 对 BSA 的荧光猝灭效应

在不同的 pH 缓冲溶液中固定 BSA 的浓度, 记录各种 pH 条件下的 BSA 内源荧光, 激发波长 280 nm, 发射波长范围 280~600 nm。酸性较强时 (pH 3.0) BSA 的最大发射峰在 331 nm; 其他酸度下 BSA 的最强荧光峰则出现在 341 nm。随 Of1x 加入, BSA 的荧光被有规律的猝灭, 同时, 最大发射峰位发生了不同程度的红移, 红移距离为 6~10 nm。pH 为 3.0 和 4.9 时 Of1x 的  $\lambda_{\max}$  为 499 nm, 随着 pH 的升高, Of1x 的发射峰蓝移至 455 nm, 且在 pH 9.0 时强度最弱。BSA 的内源荧光不能被 Of1x 完全猝灭, 如图 1 所示。

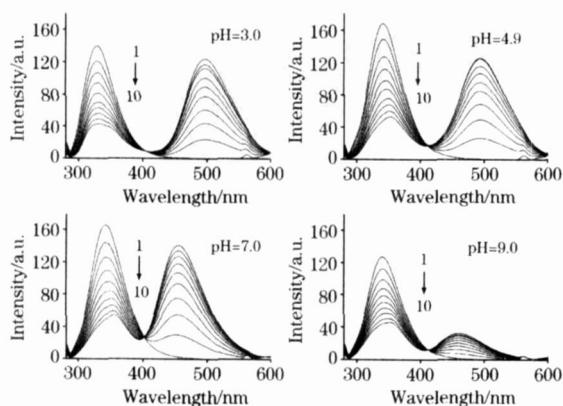


Fig 1 Effect of the Of1x on the fluorescence spectrum of BSA  
 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $C_{\text{Of1x}} : 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $C_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Curves 1—10: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5

### 2.2 Of1x 与 BSA 作用的荧光猝灭常数

实验所得数据按 Stern 方程<sup>[11-13]</sup>处理

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

式中,  $F$  和  $F_0$  分别为加入和不加入猝灭剂时 BSA 溶液的荧光强度;  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数;  $K_{\text{SV}}$  为动态猝灭常数;  $\tau_0$  为猝灭剂不在时荧光体分子平均寿命 (生物大分子的  $\tau_0$  约为  $10^{-8} \text{ s}$ );  $[Q]$  为猝灭剂的浓度。按 (1) 式以  $F_0/F$  对  $[Q]$  作图 2, 由图中斜率可得  $K_{\text{SV}}$ , 列入表 1。本实验中  $K_q = K_{\text{SV}}/10^{-8}$  所得值远大于  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 故 Of1x 对 BSA 的荧光猝灭并非分子间的动态碰撞所致, 而是由于形成复合物所引起的静态猝灭。

### 2.3 结合常数和结合位点数

位点结合模型常用来解释小分子和蛋白质等生物大分子间的作用<sup>[14]</sup>, 按此模型有

$$\frac{F_0}{F} = K [D_t] \frac{F_0}{F_0 - F} - nK [P_t] \quad (2)$$

$[D_t]$  和  $[P_t]$  分别为体系中小分子与 BSA 的总浓度, 固定  $[P_t]$ , 改变  $[D_t]$ , 以  $\frac{F_0}{F}$  对  $[D_t] \frac{F_0}{F_0 - F}$  作图, 即可求得结合常数  $K$  和结合位点数  $n$ 。根据图 1 的数据, 按 (2) 式处理, 所得结合常数  $K$  和  $n$  列入表 1, 由表中数据看出,  $K_{\text{SV}}$  相差不

大, 说明中性、弱酸和弱碱性环境对 Of1x 与 BSA 的结合不会产生太大的影响, 静电作用不是两者相互作用的主要作用力。在 pH 对 BSA 的荧光影响中, pH 4.9 时在其等电点附近, 蛋白质结构相对紧密, 由苯丙氨酸 (Phe) 残基和酪氨酸 (Tyr) 残基向色氨酸 (Trp) 残基的能量转移是非常有效的<sup>[15]</sup>。故此时结合常数 ( $1.9281 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 和结合位点数 (1.45) 较其他条件下大。pH 为 3.0 时, Trp 微环境的疏水性增强, 蛋白质局部表面疏水性降低, 此时蛋白质处于充分伸展状态; pH 为 9.0 时, 部分 Phe 残基微环境的极性增强, 表明碱诱导蛋白质分子使之充分伸展, 将更多疏水性氨基酸残基暴露于溶剂中<sup>[4]</sup>, 此时能量的传递有效性差, 结合常数和结合位点数小。

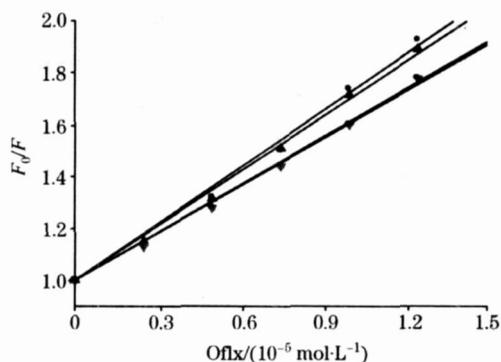


Fig 2 Stern-Volmer plots of Of1x quenching for BSA  
 $C_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 341 \text{ nm}$

Table 1 Quenching constants and binding parameters between Of1x and BSA in the solution with the different pH

pH	$K_{\text{SV}} (\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_A (\times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$	$r$
3.0	6.76	1.2875	0.97	0.9997
4.9	8.63	1.9281	1.45	0.9993
7.0	8.35	1.5629	1.20	0.9971
9.0	6.76	0.9705	0.99	0.9988

### 2.4 Of1x 与 BSA 的结合距离

根据 Förster 能量转移机理, 转移效率  $E$  与给体~受体间距离  $r$ 、临界能量转移距离  $R_0$  以及给体荧光光谱和受体吸收光谱间的重叠积分  $J$  值有关, 可由文献 [16] 的公式 (8-11) 求得, 所得结果列入表 2。数据显示: 各 pH 下的  $r$  值均小于 7 nm, 符合能量转移理论, 说明 Of1x 与 BSA 结合过程中, 非辐射能量转移是导致 BSA 荧光猝灭的原因之一。各条件下的  $r$  值变化不大, 同样说明了中性、弱酸和弱碱性环境对

Table 2 Overlap integral  $J$ , the energy transfer efficiency  $E$  and the binding distance  $r$  of combination Of1x with BSA under different pH

pH	$J/10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$E$	$r/\text{nm}$
3.0	8.97	0.2384	2.89
4.9	9.36	0.4244	2.55
7.0	8.35	0.3435	2.65
9.0	8.69	0.3752	2.61

Of1x 与 BSA 的结合不会产生太大的影响。在 pH 4.9 时, 蛋白质结合紧密,  $r$  值明显减小,  $E$  值增大, Of1x 对 Trp 的猝灭作用就会增强, 与前面在此 pH 下  $K_{sv}$  较大的实验结果相吻合。而在较强的酸性环境中, BSA 分子自身肽链伸展, Of1x 分子与 Trp 残基之间的距离增大, 降低了二者间的共振能量转移。

### 2.5 Of1x 对 BSA 的构象的影响

在 BSA 的普通荧光光谱中, Tyr 和 Trp 残基的激发波长

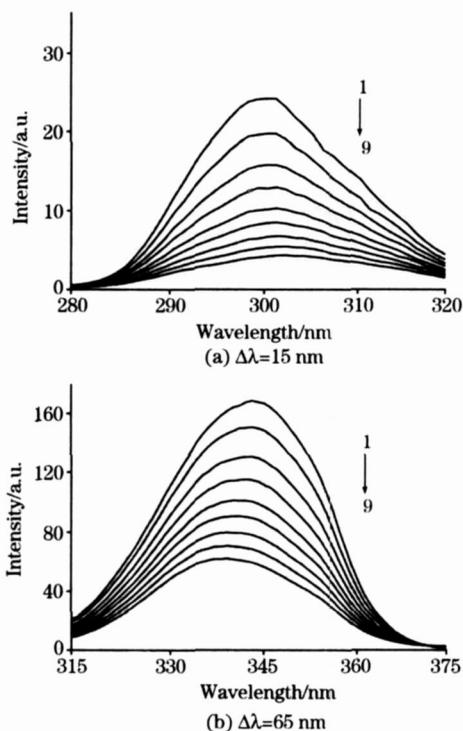


Fig 3 Effect of the Of1x on the synchronous fluorescence spectrum of BSA

$c_{BSA} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c_{Of1x} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

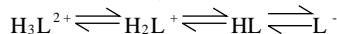
Curves 1—9: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0

分别为 280 和 295 nm, 由于 Tyr 向 Trp 残基的能量转移, 两种氨基酸发射峰位置相同, 均表现为 Trp 残基的荧光, 因此 Tyr 和 Trp 残基的荧光不能被区分出来。选择  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 65 \text{ nm}$  扫描同步荧光光谱, 可以明确地将 BSA 中 Tyr 和 Trp 残基的荧光峰分辨出来<sup>[17]</sup>。如图 3 所示: 在 pH 4.9 时, Of1x 加入使 Tyr 和 Trp 的同步荧光强度减弱,  $\Delta\lambda = 65 \text{ nm}$  的同步荧光光谱减弱的同时发生了蓝移,  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  却没有观察到此种现象, 说明随着 Of1x 的加入 Trp 残基的微环境发生了改变, 在 Of1x 作用下色氨酸所处环境的疏水性增加。

### 2.6 讨论

随着 Of1x 的加入, BSA 的最大荧光发射峰值减小, 而且其峰位也发生了红移(从 341 移到 350 nm 左右)。聂丽华<sup>[18]</sup> 等认为色氨酸的最大荧光发射峰位对环境很敏感, 在疏水环境中其最大峰位约为 332 nm, 完全暴露于水相中时则约为 352 nm, 部分暴露于水相中时则约为 342 nm, 由此可以认为 Of1x 与 BSA 结合后, BSA 的螺旋结构逐渐舒展开来, 从而使色氨酸残基从蛋白质的疏水环境中暴露出来而进入水相中。故随着 Of1x 的加入, 氧氟沙星对 BSA 的猝灭曲线, 在结合数为 1.25 以后发生了向上弯曲, 猝灭效应增强, 可能是给体-受体间的作用由第一类结合转为第二类结合<sup>[19]</sup>。

如图 1 所示, 氧氟沙星在酸性环中最大吸收峰为 499 nm, 中性或碱性环境中最大吸收峰 455 nm, 且在强碱性溶液中荧光强度很弱, 这是由于 Of1x 存在以下的转变形式<sup>[20]</sup>



在 pH 2.5~4.0 范围内, Of1x 以  $\text{H}_2\text{L}^+$  形式存在,  $\lambda_{\text{max}}$  为 499 nm。当 pH > 4.0 时, 随 pH 值升高, 位于 499 nm 的荧光发射峰逐渐蓝移至 455 nm, 是由于 C-3 位羧基质子的离解。在 pH 7.0 左右, Of1x 以双极离子 HL 形式存在,  $\lambda_{\text{max}}$  为 455 nm, 是最强的荧光型体。当 pH > 8 时, 随 pH 值升高,  $\lambda_{\text{max}}$  由 455 nm 红移, 同时荧光强度下降, 表明 HL 失去哌嗪环 N-4 上结合的质子。上述结果表明介质环境对 Of1x 的荧光性质有一定影响。

### 参 考 文 献

- [1] Skauge T, Turel I, Sletten Einar. *Inorganica Chimica Acta*, 2002, 339: 239.
- [2] Trynda-Lemiesz L, Keppler B K, Kozlowski H. J. *Inorg Biochem*, 1999, 73(3): 123.
- [3] Charies B B, Hudson B S. J. *Biological Chem.*, 1979, 254: 391.
- [4] Dockal M, Carter D C, Ruker F. J. *Biological Chem.*, 2000, 275: 3042.
- [5] White D D, Sheena Stewart, Wood G C. *The Federation of European Biochemical Sciences (FEBS), Letters*, 1973, 33: 305.
- [6] Tanaka N, Nishizawa H, Kunugi S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1338: 13.
- [7] Harmsen B J M, De Bruin S H, Janssen J H M. *Biochemistry*, 1971, 10: 3217.
- [8] Basir Ahmad, et al. *Archives of Biochem. Biophys.*, 2005, 437: 159.
- [9] Octaaf J M Bos, Marcel J E Fischer, Jaap Wilting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1988, 953: 37.
- [10] Basir Ahmad, et al. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 1350.
- [11] Eftink M R, Ghiron C A. *Anal. Biochem.*, 1981, 114: 199.
- [12] YI Ping-gui, SHANG Zhi-cai, YU Qing-sen, et al (易平贵, 商志才, 俞庆森, 等). *Acta Chimica Sinica (化学学报)*, 2000, 58(12): 1649.
- [13] Johansson J S. J. *Biol. Chem.* 1997, 272: 17961.
- [14] YI Ping-gui, SHANG Zhi-cai, YU Qing-sen, et al (易平贵, 商志才, 俞庆森, 等). *Acta Chimica Physical Sinica (化学物理学报)*, 2003,

- 16: 420.
- [15] WEI Xiao-fang, DING Xi-ming, LIU Hui-zhou(魏晓芳, 丁西明, 刘会洲). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20: 556.
- [16] YANG Man-man, YANG Pin, XI Xiao-li(杨曼曼, 杨 频, 席小莉). Chinese Science Bulletin(科学通报), 2005, 20: 2199.
- [17] QIN Shen-jun, WEI Yong-ju(秦身钧, 魏永巨). Journal of the Chinese Rare Earth Society(中国稀土学报), 2004, 22: 393.
- [18] NIE Li-hua, ZHAO Hui-chun, WANG Xue-bin(聂丽华, 赵慧春, 王学斌). Journal of Beijing Normal University · Natural Science(北京师范大学学报 · 自然科学版), 2001, 37: 87.
- [19] YANG Man-man, YANG Pin, XI Xiao-li(杨曼曼, 杨 频, 席小莉). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2006, 27: 687.
- [20] LIU Cui-ge, XU Yi-zhuang, WEI Yong-ju(刘翠格, 徐怡庄, 魏永巨). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25: 584.

## Effect of Acidity on the Interaction of Ofloxacin and Bovine Serum Albumin

TANG Zhen-qiang<sup>1</sup>, HE Gan-wu<sup>2</sup>, YI Ping-gui<sup>1\*</sup>

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Molecular Structure-Activity Relationship Key Lab Hunan Province University, Xiangtan 411201, China
2. Shaoyang University, Shaoyang 422004, China

**Abstract** Bovine serum albumin (BSA) exists as N (pH -7.0), B (pH -9.0), and E (pH < 3.5) = isomeric forms in the solution of different pH. Acid effect on the structure of bovine serum albumin and the interaction of different structure of BSA with Ofloxacin were studied by UV-Vis and fluorescence spectroscopy. Based on the fluorescence quenching of bovine serum albumin and Förster energy transfer mechanism, the quenching constants, energy transfer efficiencies and the binding distances were determined at four different pHs. The results showed that Ofloxacin has the ability to quench bovine serum albumin fluorescence with the optimal condition of fluorescence quenching constants of  $1.9281 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , binding distance of  $r = 2.55 \text{ nm}$  and quenching efficiency of  $8.63 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  at pH 4.9. Non-radiative energy transfer and static quenching were the cause of fluorescence quenching. The influence on the binding of Ofloxacin and bovine serum albumin under neutral, subacidity and alkaline conditions was not obviously observed, and the electrostatic interaction was not the main force. The effect of Ofloxacin on the conformation of BSA was also investigated using synchronous fluorescence spectrometry.

**Keywords** Ofloxacin; Bovine serum albumin; Fluorescence quenching; Synchronous fluorescence

(Received Dec. 11, 2006; accepted Mar. 16, 2007)

\*Corresponding author