

荧光光谱法研究四苯基-锌金属卟啉与蛋白质的相互作用机理

张丽娜, 陈欣, 夏阳, 吴丹, 于京华, 杜斌, 魏琴

济南大学化学与化工学院, 山东 济南 250022

摘要 利用荧光光度法研究了 *meso*-四(4-羟基苯基)卟啉-锌金属卟啉 (TPP-Zn) 与牛血清白蛋白 (BSA) 之间的结合反应。TPP-Zn 对于 BSA 有荧光猝灭作用, 基于 TPP-Zn 对 BSA 内源荧光的猝灭机理, 测定了两者在不同温度下的结合常数, 温度在 27, 35 和 42 °C 时, 利用荧光猝灭法测得的结合常数 K 分别为 $1.521 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $7.048 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $1.473 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 各温度下的最大扩散碰撞猝灭速率常数 K_q 均大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 由此判定猝灭类型为静态猝灭。根据 Förster 非辐射能量转移理论, 确定了 TPP-Zn 与 BSA 之间的能量转移效率 E , 能量给体 (BSA) 与受体 (TPP-Zn) 之间的结合距离 $r = 3.72 < 7 \text{ nm}$, 符合非辐射能量转移条件。依据热力学参数 $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$ 确定了 TPP-Zn 与 BSA 之间的作用力主要是静电引力。

关键词 TPP-Zn; BSA; 结合常数; 能量转移; 荧光猝灭机理; 作用力类型

中图分类号: O657 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)03-0773-04

引言

血清白蛋白是血液中最丰富的蛋白质, 它可以与体内代谢物、有机化合物、内源性药物及某些金属离子相互作用, 从而影响到生物体的各种生理机能^[1, 2]。特别是与药物小分子化合物结合机理的研究对其生理功能的理解有着重要意义^[3-6]。近年来, 利用多种手段研究它们之间相互作用的机理是目前人们广泛关注的焦点。荧光光谱技术因其高灵敏度、易操作性的优点而被广泛采用, 其发射峰特征、能量转移及荧光寿命等指标可以对蛋白质分子中荧光生色基团的结构及其所处的微环境提供有效的信息^[7-9]。

卟啉化合物已被广泛应用于医学及生物学等多学科的应用研究^[10, 11], 该类化合物具有促进细胞组织呼吸、改善蛋白质和糖代谢等作用。四苯基-锌金属卟啉 (TPP-Zn) 是一种含有金属离子的对称性卟啉, 该卟啉由本实验室合成并表征, 它的结构如图 1 所示。研究 TPP-Zn 和 BSA 相互作用对了解内源性或外源性金属卟啉在血液中储存、运输和作用机理等有重要意义。本文利用荧光光度法和能量转移理论探讨了不同温度下 TPP-Zn 与 BSA 内源荧光的猝灭机理。证实两者的相互结合作用主要为静态猝灭和非辐射能量转移过程, 并推断了 TPP-Zn 与 BSA 之间的作用力类型。这对进一步研究该金属卟啉及其衍生物在生物体内的作用提供了重要信息。

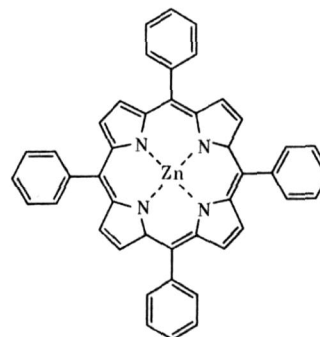


Fig 1 Structure of tetraphenyl porphyrin-zinc

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LS-55 荧光分光光度计 (美国 Perkin-Elmer 公司); BSA 标准溶液 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 准确称取 0.165 0 g BSA (济南爱博金贸有限公司), 加入少量二次水溶解后转移至 250 mL 容量瓶中, 用二次水定容, 摇匀, 放入冰箱 4 °C 下保存; Tris-HCl 缓冲溶液, 分别配制 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液, 按 25 : 21 的配比配成 pH 7.40 缓冲溶液。以上实验所用试剂均为分析纯, 用水均为二次蒸馏水。

收稿日期: 2008-05-10, 修订日期: 2008-08-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20577016), 山东省自然科学基金项目 (Y2006B36) 和山东省自然科学基金项目 (Y2008B44) 资助

作者简介: 魏琴, 女, 1961 年生, 济南大学化学与化工学院教授 e-mail: sdjndxwq@163.com

1.2 实验方法

于 10 mL 比色管中依次加入 1.00 mL pH 7.40 Tris-HCl 缓冲溶液、1.00 mL NaCl 盐溶液 ($0.50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、BSA 溶液 ($2.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以及不同体积的 TPP-Zn ($9.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)，二次水定容、摇匀。固定激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ，激发和发射狭缝宽度均为 10.0 nm，在 300 ~ 400 nm 范围内扫描发射光谱，分别测定不同温度下 TPP-Zn 对 BSA 的猝灭荧光光谱图。

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭光谱

蛋白质分子中能发出荧光的氨基酸残基有色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe) 残基，其中蛋白质的内源荧光主要是 Trp 和 Tyr 残基所发射的^[12]。图 2 是激发波长为 280 nm 时，不同浓度的 TPP-Zn 与固定浓度的 BSA 结合反应的猝灭荧光光谱。由图中可以观察到随着 TPP-Zn 的浓度增加，BSA 的内源荧光强度在 342 nm 附近呈现有规律的降低，同时，BSA 的最大发射峰位发生了红移。所有这些均说明 TPP-Zn 与 BSA 之间形成了复合物^[13]。

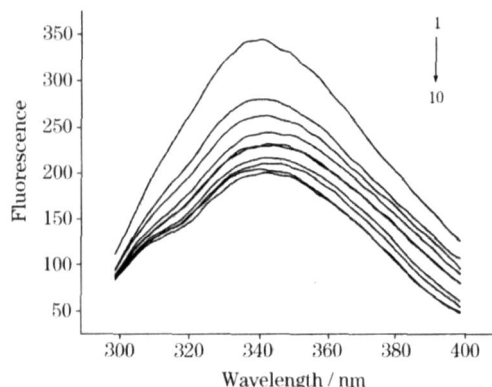


Fig 2 Effect of TPP-Zn on the fluorescence emission spectra of BSA

Conditions: $c_{\text{BSA}} = 2.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{TPP-Zn}} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\text{TPP-Zn}} (1-10)$: 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.15, 0.18, 0.20, 0.24 mL; $t = 27$

2.2 猝灭机理和形成常数的测定

荧光猝灭包括动态猝灭和静态猝灭。区分荧光猝灭是动态猝灭还是静态猝灭，一是看相互作用物质间是否形成基态配合物，二是依据荧光猝灭常数随温度的变化关系来确定。对于动态猝灭，荧光猝灭常数随温度升高而增大；对于静态猝灭则反之^[14]。测定 27, 35 和 42 温度下实验体系的荧光光谱随 TPP-Zn 浓度的变化情况，为了判断猝灭类型，首先假设该猝灭为动态猝灭，以 $(F_0/F) - 1$ 对 c_Q 作图 (F_0 为不存在猝灭剂 TPP-Zn 时 BSA 的荧光强度， F 为存在猝灭剂时 BSA 的荧光强度)，绘制不同温度下 TPP-Zn 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图 (见图 3)。根据动态猝灭方程，计算出动态猝灭常数 K_{SV} 。

$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}} c_Q = 1 + K_q \tau_0 c_Q$$

其中， K_q 为双分子猝灭过程速率常数， K_{SV} 为 Stern-Volmer 动态猝灭常数， τ_0 为猝灭体不存在时荧光分子的平均寿命， c_Q 为猝灭剂浓度。

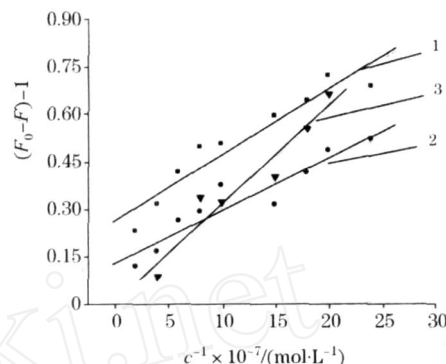


Fig 3 Stern-Volmer quenching plot of BSA with increasing concentration of TPP-Zn

1: $t = 27$; 2: $t = 35$; 3: $t = 42$

据文献报道生物大分子的荧光寿命大约为 10^{-8} s ，故可由猝灭曲线的斜率求得动态猝灭常数，由 $K_{\text{SV}} = K_q \tau_0$ 可以求得 TPP-Zn 对 BSA 荧光猝灭过程速率常数 K_q 。由图 3 得到 27, 35, 42 时的 K_{SV} 分别为 0.208×10^6 , 0.167×10^6 和 $0.312 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，并且相应的 $K_q = 0.208 \times 10^{14}$, 0.167×10^{14} 和 $0.312 \times 10^{14} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在动态猝灭过程中，一般情况下各类猝灭剂对生物分子的最大扩散碰撞猝灭速率常数 K_q 不大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[15]。由结果综合看出，虽然 K_{SV} 随着温度进一步升高先减小后增大，但 TPP-Zn 对 BSA 荧光猝灭过程速率常数 K_q 远远大于扩散控制常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ，证明以上猝灭不是由于动态碰撞而引起的，是形成了复合物而引起的静态猝灭。

根据静态猝灭结合常数的 Lineweaver-Burk 双倒数函数关系式^[16]

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{\text{LB}}^{-1} F_0^{-1} c_Q^{-1}$$

作出不同温度下 TPP-Zn 对 BSA 荧光猝灭的双倒数图 (见图 4)。从图中得到 27, 35, 42 温度下 TPP-Zn 与 BSA 的结合常数 K_{LB} 分别为 $1.521 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $7.048 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $1.473 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。说明 TPP-Zn 和 BSA 有较

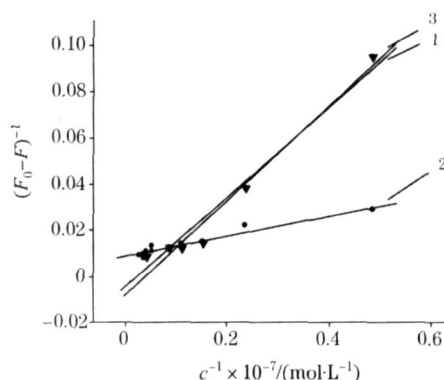


Fig 4 Double-reciprocal curves of fluorescence intensity with concentration of TPP-Zn

1: $t = 27$; 2: $t = 35$; 3: $t = 42$

强的结合力, 并且结合常数 K_{LB} 随着温度的升高而减小, 更加证明了该猝灭过程为静态猝灭。

2.3 BSA 和 TPP-Zn 之间的能量转移

根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论^[17], (1) 当供能体发射荧光, 其荧光发射与受能体的吸收光谱有足够的重叠; (2) 且供能体 (BSA) 与受能体 (TPP-Zn) 足够接近, 最大距离不超过 7 nm; (3) 供能体有较高的荧光量子产率; 综上所述, 则会发生非辐射能量转移, 导致荧光猝灭, 由此可求出两者的结合位置相对于发射荧光的基团之间的距离。

卟啉与蛋白质的物质的量为 1 : 1 时 TPP-Zn 吸收光谱与 BSA 荧光光谱见图 5, 根据理论, 荧光体与猝灭体之间的能量转移效率 (E) 和两者之间的距离 (r) 的关系为

$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)} \quad (1)$$

其中 R_0 为能量转移效率为 50 % 时的对应距离。

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \phi J \quad (2)$$

式中 K^2 为偶极空间取向因子, 可取受能体和供能体各项随机分布的平均值 $2/3$; N 为介质折射指数, 一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336, ϕ 为给体 BSA 的荧光量子产率, 通常取蛋白质中色氨酸量子产率为 0.118^[17], J 为给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱的重叠积分, 可表示为

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad (3)$$

$F(\lambda)$ 为荧光给体 (BSA) 在波长 λ 时的荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 为受体 (染料探针) 在波长 λ 处的摩尔吸光系数, $\Delta\lambda$ 为计算时分割的波长跨度。将波长在 300 ~ 400 nm 范围内的重叠光谱划分为极小的面积求和, 由式 (3) 求得重叠积分 $J = 8.42 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。代入式 (2) 求得临界距离 $R_0 = 3.50 \text{ nm}$ 。

而能量转移效率 E 又可以由式 (4) 测定

$$E = 1 - F/F_0 \quad (4)$$

其中 F 和 F_0 分别为能量接受体存在和不存在时能量给予体的荧光发射强度。求得能量转移效率 $E = 0.41$, 将上述计算得出的 E 和 R_0 代入式 (1) 得到 TPP-Zn 与 BSA 荧光残基间的距离 $r = 3.72 \text{ nm}$, 小于 7 nm, 符合非辐射能量转移条件, 更进一步说明 TPP-Zn 与 BSA 的结合是通过非辐射能量转移机制导致蛋白质荧光猝灭的。

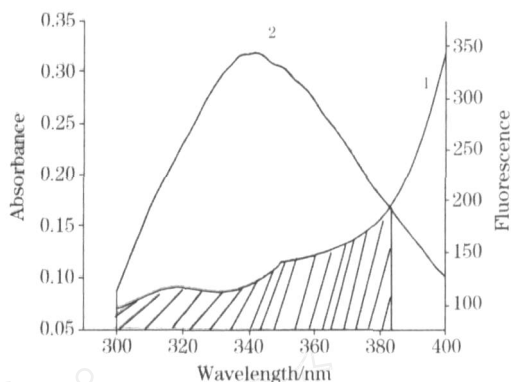


Fig 5 Overlap spectra of TPP-Zn absorption spectra(1) and BSA fluorescence spectra(2)

Conditions: $c_{BSA} = c_{TPP-Zn} = 2.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.4 猝灭过程中热力学函数的变化

卟啉与生物大分子之间的作用力包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等。(5) 式 ~ (7) 式中 ΔG 为吉布斯生成自由能, ΔH 为焓变, ΔS 为熵变。当温度变化不大时, 结合反应的焓变 ΔH 可看成一个常数, 根据以下热力学公式可求得 TPP-Zn 与 BSA 结合的热力学函数值, 结果列于表 1。

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

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (6)$$

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (7)$$

Table 1 Thermodynamic parameters of BSA with TPP-Zn

温度 t /	ΔG / (kJ · mol ⁻¹)	ΔH / (kJ · mol ⁻¹)	ΔS / (J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)
27	- 3.195		64.00
35	- 3.918	- 1.467	70.03
42	- 4.155		64.00

Ross 等^[17] 根据大量的实验结果, 总结出了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。由表 1 可知, $\Delta G < 0$, 反应过程是自发的, 并且 $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, 可以看出 TPP-Zn 与 BSA 之间的作用力主要是通过蛋白质分子表面负电荷与 TPP-Zn 中的正电荷形成的静电引力。但应当指出, 血清白蛋白结构很复杂, 它和猝灭剂之间往往同时存在几种作用力。

参 考 文 献

- [1] Gharibi H, Javadian S, Hashemianzadeh M. Colloids and Surfaces A, 2004, 232: 77.
- [2] Guo C Y, Wu X, Yang J H, et al. Photochemistry and Photobiology A, 2006, 181(1): 50.
- [3] CAO Xi-min, DU Li-ming(曹雪敏, 杜黎明). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(5): 973.
- [4] WU D, DU B, MA H M, et al. Spectroscopy Letters, 2006, 39(4): 399.
- [5] YANG Man-man, XI Xiao-li, YAN Pin(杨曼曼, 席小莉, 杨 频). Chemical Journal Chinese University(高等学校化学学报), 2006, 27(4): 679.
- [6] Wolff J, Knipling L. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(28): 16809.

- [7] LIU Luo-sheng, WANG Xing-bo, ZHAO Quan-qin(刘洛生, 王兴玻, 赵全芹). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(6): 1130.
- [8] WU Qiu-hua, WANG Chun, WANG Zhi, et al(吴秋华, 王 春, 王 志, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(12): 2498.
- [9] LI Dan, JIANG Xin-min, YAN Zheng-yu(李 丹, 姜新民, 严拯宇). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(6): 1312.
- [10] Zhou H C, Baldini L, Hong J. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128: 2421.
- [11] YAN Mei, CHEN Xin, SUN Shur-ting, et al(颜 梅, 陈 欣, 孙舒婷, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(6): 1322.
- [12] WU Dan, XU Gui-ying(吴 丹, 徐桂英). Acta Physico-Chimica Sinica(物理化学学报), 2006, 22(2): 254.
- [13] Burstein E A, Vedenkina N S, Ivkova M N. Photochemistry and Photobiology, 1973, 18: 263.
- [14] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Methods of Fluorescence Analysis, 2nd Ed(荧光分析法·第2版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 112.
- [15] Ware W R. Journal of Physical Chemistry, 1962, 66(3): 455.
- [16] 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.
- [17] Ross D P, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096.

Study on Interaction Mechanism between Mes σ Tetra-(4-Hydroxyphenyl)-Zn Porphyrin and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Method

ZHANG Li-na, CHEN Xin, XIA Yang, WU Dan, YU Jing-hua, DU Bin, WEI Qin

School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Ji 'nan 250022, China

Abstract In the present paper, the binding reaction between mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin (TPP-Zn) and bovine serum albumin (BSA) was studied at different temperatures by fluorescence method. It was shown that mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin has a strong ability of quenching the fluorescence of bovine serum albumin. Based on the mechanisms of fluorescence quenching of bovine serum albumin caused by mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin, the binding constants between mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin and bovine serum albumin were measured under different temperatures. The experiment showed that mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin and bovine serum albumin have strong interactions. The binding constants of the reaction at 27, 35 and 42 were $1.521 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $7.048 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $1.473 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively, and were decreased with increasing the temperature. The constants of maximum diffusion collision quenching rate K_q were above $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Therefore, the sort of quenching between mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin and bovine serum albumin was determined as static quenching. By the theory of Förster of non-radiation energy transfer, the binding distance and the energy transfer efficiency at 27 between mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin (accepter of energy) and bovine serum albumin (donor of energy) were obtained, respectively. The binding distance was 3.72 nm, which is less than 7 nm, therefore, the interaction was similar to the non-radiation energy transfer, and the static quenching was further proved. According to the thermodynamic parameters, the main sorts of binding force between mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin and bovine serum albumin could be judged as electrostatic force when $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$ and $\Delta S > 0$.

Keywords Mes σ tetra-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin; Bovine serum albumin; Binding constant; Non-radiation energy transfer; Fluorescence quenching; Sorts of binding force

(Received May 10, 2008; accepted Aug. 6, 2008)