

荧光光谱法研究二溴羟基卟啉与蛋白质的结合作用机理

颜梅, 陈欣, 孙舒婷, 马洪敏, 杜斌, 魏琴*

济南大学化学与化工学院, 山东 济南 250022

摘要 应用荧光光谱法研究了 *meso*-四(3,5-二溴-4-羟基苯基)卟啉[T(DBHP)P]与牛血清白蛋白(BSA)之间的结合反应, 基于 T(DBHP)P 对 BSA 内源荧光的猝灭机理, 测定了两者之间在不同温度下的结合常数, 温度为 27 °C 时, 荧光猝灭法测得反应的结合常数为 $K=1.30 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 温度为 48 °C 时, $K=6.32 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合常数随温度升高而减小, 由此判定该猝灭类型为静态猝灭。根据 Förster 非辐射能量转移理论, 确定了 T(DBHP)P 与 BSA 之间的能量转移效率 $E=0.91$, 能量给体(BSA)与受体[T(DBHP)P]之间的结合距离 $r=2.39 \text{ nm} < 7 \text{ nm}$, 符合非辐射能量转移条件。依据热力学参数 $G < 0$, $H < 0$, $S > 0$ 确定了 T(DBHP)P 与 BSA 之间的作用力主要是静电引力。同时, 利用同步荧光光谱, 考察了 T(DBHP)P 对 BSA 构象的影响, 结果发现, T(DBHP)P 的加入使 BSA 构象发生变化, BSA 内部残基所处环境的疏水性降低。

关键词 BSA; T(DBHP)P; 结合常数; 能量转移; 荧光猝灭机理; 同步荧光光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)06-1322-05

引言

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白, 它可以与体内代谢物、有机化合物、内源性药物及 Ca^{2+} , Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 等金属离子作用^[1-6], 特别是与药物等小分子化合物结合机理的研究可以提供很多重要的信息, 它们之间结合性质的细节性研究对其生理功能的理解至关重要, 并且对药物传输功能的控制有很大的帮助^[7-9]。近年来, 利用多种手段研究它们之间相互作用的机理引起了人们广泛的兴趣。其中最为重要的荧光光谱技术具有较高的灵敏度、易操作及设备简便的优点。而且, 荧光测试中的发射峰特征、荧光偏振、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用信息^[10]。

卟啉化合物广泛应用于医学及生物学等多学科的研究。*meso*-四(3,5-二溴-4-羟基苯基)卟啉[T(DBHP)P]是一种含有吸电基团溴的对称性卟啉, 我们已将其用于核酸及蛋白质的定量测定^[11], 在前期工作的基础上, 本文利用荧光光度法和能量转移理论探讨了不同温度下 T(DBHP)P 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 T(DBHP)P 与 BSA 之间的作用力类型。利用同步荧光光谱技术考察了 T(DBHP)P

对 BSA 构象的影响。这对进一步研究卟啉在生物体内的作用提供了重要信息。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LS-55 型荧光分光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司)。

BSA 标准溶液: 准确称取 0.1650 g BSA(济南爱博经贸有限公司), 加入少量二次水溶解后转移至 250 mL 容量瓶中, 定容, 摇匀, 于 4 °C 下储存。此标准溶液含 BSA $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**T(DBHP)P 标准溶液**: 称取 0.0130 g T(DBHP)P, 用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解, 并用 DMF 定容于 100 mL 容量瓶中, 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

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(Tris)和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液, 按 25 : 21 的配比配成 pH 7.40 的缓冲溶液。

NaCl 溶液($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 准确称取 1.1689 g NaCl 溶于少量水中, 然后转入 100 mL 容量瓶中, 定容, 摇匀备用。以上实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

于 10 mL 比色管中依次加入 2.00 mL pH 7.40 Tris-HCl 缓冲溶液、2.00 mL NaCl 溶液($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、2.50

收稿日期: 2007-08-26, 修订日期: 2007-11-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(20577016)和山东省自然科学基金项目(Y2004B11)资助

作者简介: 颜梅, 女, 1977年生, 济南大学化学与化工学院讲师 *通讯联系人 e-mail: sjndxwq@263.net

mL BSA 溶液 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以及不同体积的 T(DBHP)P ($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)，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 $300 \sim 400 \text{ nm}$ 范围内扫描发射光谱，测定 T(DBHP)P 对 BSA 的荧光猝灭光谱图。

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭光谱和结合常数的测定

蛋白质分子中的色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe) 残基能吸收发射荧光，所以蛋白质具有内源荧光，其中蛋白质的内源荧光主要是 Trp 和 Tyr 残基所发射的。如图 1 所示，当固定 BSA 的浓度，随着 T(DBHP)P 的浓度增加，BSA 的内源荧光强度呈现有规律的降低，同时，BSA 的最大发射峰位发生蓝移。所有这些均说明 T(DBHP)P 与 BSA 之间形成了复合物。Trp 残基的最大荧光发射峰对外界环境极度敏感^[12]，当它们暴露在水介质中，最大发射峰位于 $350 \sim 353 \text{ nm}$ 之间；如果它们完全暴露于疏水环境中，最大发射峰位将大幅度的蓝移。从图 1 中可以看出最大发射峰从 350 nm 处蓝移至 316 nm 处。所以可以认为 Trp 残基随着 T(DBHP)P 浓度的增加已经水介质进入疏水环境中。

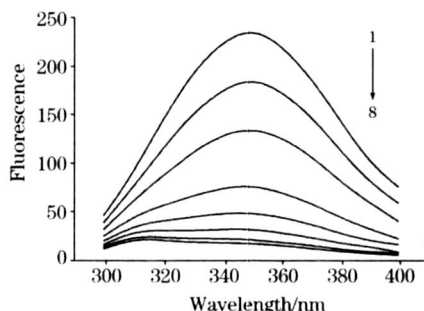


Fig 1 Effect of T(DBHP)P on the fluorescence emission spectra of BSA

Conditions: [BSA] = $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; [T(DBHP)P] = $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\text{T(DBHP)P}}(1-8)$: 0; 0.02; 0.05; 0.10; 0.15; 0.20; 0.25; 0.30 mL

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。分别测定 27 和 48 温度下实验体系的荧光光谱随 T(DBHP)P 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，绘制不同温度下 T(DBHP)P 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图 (见图 2)。根据动态猝灭方程^[13]

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

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。

据文献报道生物大分子的荧光寿命 τ_0 大约为 10^{-8} s ^[14]，由猝灭曲线的斜率可求得动态猝灭常数 K_{SV} ，由 $K_{\text{SV}} = K_q \tau_0$

可以求得 T(DBHP)P 对 BSA 荧光猝灭过程速率常数 K_q 。由图 2 求得的不同温度下的 K_{SV} 及 K_q 列于表 1 中。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]。综上所述可以看出， K_{SV} 随温度的升高而减小，且 T(DBHP)P 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。

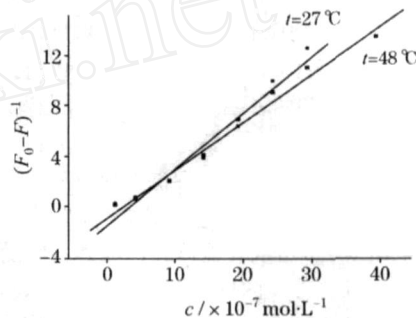


Fig 2 Stern-Volmer quenching plot of BSA with increasing concentration of T(DBHP)P

杨曼曼^[15]等提出了求取有机小分子与蛋白质等生物大分子相互作用的静态猝灭结合常数的 Lineweaver-Burk 双倒数函数关系式

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

作出 27 和 48 温度下 T(DBHP)P 对 BSA 荧光猝灭的双倒数图，见图 3。从图中得到两个温度下的线性方程： $t = 27$ ， $(F_0 - F)^{-1} = 3.3 \times 10^{-3} + 0.329 \times 10^{-8} c^{-1}$ ； $t = 48$ ， $(F_0 - F)^{-1} = 1.3 \times 10^{-4} + 0.537 \times 10^{-8} c^{-1}$ ，由直线斜率和 F_0 ，分别求得 27 和 48 温度下 T(DBHP)P 与 BSA 的结合常数 K_{LB} 的值，列于表 1。温度对 T(DBHP)P 和 BSA 的结合常数影响较小，说明 T(DBHP)P 和 BSA 有较强的结合力。

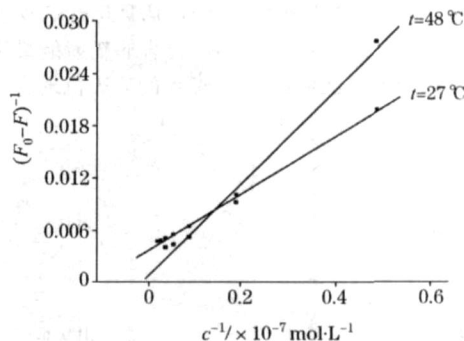


Fig 3 Double-reciprocal curves of fluorescence intensity with concentration of T(DBHP)P

2.2 BSA 和 T(DBHP)P 之间的能量转移

根据 Förster 非辐射能量转移理论^[16]，当两种化合物分子满足以下因素时，将发生能量转移：(1) 供能体的荧光发射与受能体的吸收光谱有足够的重叠；(2) 供能体 (BSA) 与受能体 (T(DBHP)P) 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。

Table 1 Binding parameters of BSA with T(DBHP)P at different temperature

| $t/$ | K_{sv} / (L · mol ⁻¹) | K_q / (L · mol ⁻¹ · s ⁻¹) | K_{LB} / (L · mol ⁻¹) |
|------|--|---|--|
| 27 | 4.44 × 10 ⁶ | 4.44 × 10 ¹⁴ | 1.30 × 10 ⁶ |
| 48 | 3.78 × 10 ⁶ | 3.78 × 10 ¹⁴ | 6.32 × 10 ⁵ |

卟啉与蛋白质的物质的量为 1 : 1 时 T(DBHP)P 吸收光谱与 BSA 荧光光谱见图 4, 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

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

其中 R_0 为能量转移效率为 50% 时的对应距离。

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

式中 K^2 为取向因子, 可取受能体和供能体各向随机分布的平均值 $2/3$ ^[16]; N 为介质的折射指数, 一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336^[16], ϕ_f 为给体的量子产率, 通常取蛋白质色氨酸量子产率为 0.118^[16], 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

$$J = \frac{\int F(\lambda) \epsilon(\lambda) d\lambda}{\int F(\lambda) d\lambda} \quad (3)$$

式中 $F(\lambda)$ 为荧光给体 (蛋白质) 在波长 λ 时的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 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 $J = 8.54 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。代入式 (2) 求得临界距离 $R_0 = 3.51 \text{ nm}$ 。

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 $E = 0.91$, 将上述计算得出的 E 和 R_0 代入式 (1) 得到 T(DBHP)P 与 BSA 荧光残基间的距离 $r = 2.39 \text{ nm}$, 小于 7 nm, 符合非辐射能量转移条件, 更进一步说明 T(DBHP)P 与 BSA 的猝灭机理为静态猝灭。

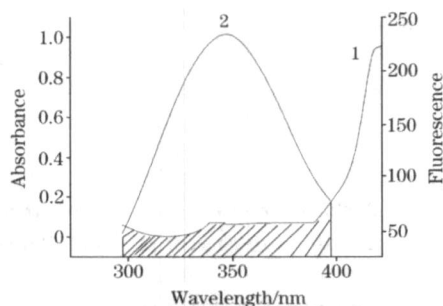


Fig 4 Overlap spectra of T(DBHP)P absorption spectra (1) and BSA fluorescence spectra (2)

Conditions: [BSA] = [T(DBHP)P] = $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 猝灭过程中热力学函数的变化

卟啉作为有机小分子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^[17], 卟啉不同, 与蛋白质作用力类型也不同。(5) ~ (7) 式中 G 为吉布斯生成自由能, H 为焓变, S 为熵变。当温度变化不大时, 结合反应的焓变 H 可看成一个常数, 根据以下热力学公式可求得 T(DBHP)P 与 BSA 结合的热力学函数值, 结果列于表 2。

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

$$G = - R T \ln K \quad (6)$$

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

Table 2 Thermodynamic parameters of BSA with T(DBHP)P

| $t/$ | G (kJ · mol ⁻¹) | H (kJ · mol ⁻¹) | S (J · mol ⁻¹ · K ⁻¹) |
|------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| 27 | -35.11 | -27.50 | 25.36 |
| 48 | -35.65 | -27.50 | 25.39 |

Ross^[17] 等根据大量的实验结果, 总结了根据反应前后热力学焓变 H 和熵变 S 的相对大小, 可以判断荧光猝灭剂与蛋白质之间的主要作用力类型。由表 2 可知, $G < 0$, 说明反应过程是自发的, 并且 $H < 0$, $S > 0$, 可以看出 T(DBHP)P 与 BSA 之间的作用力主要是通过蛋白质分子表面负电荷与 T(DBHP)P 正电荷形成的静电引力。但对于一个实际体系, 其宏观表现可能是几种作用力同时作用和有关环境综合调控的结果。

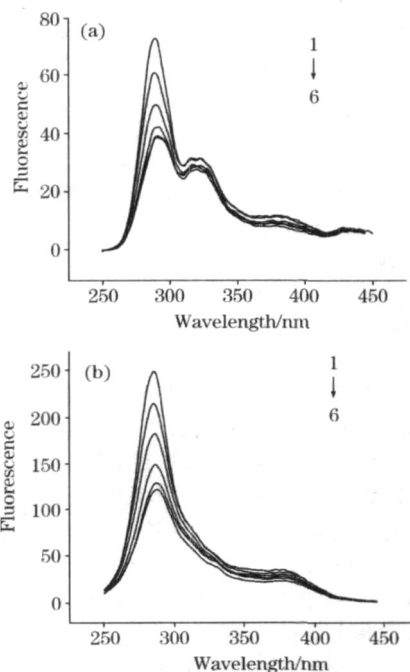


Fig 5 Synchronous fluorescence spectra of BSA

Conditions: [BSA] = $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; [T(DBHP)P] = $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $V_{\text{T(DBHP)P}}(1-6)$: 0; 0.02; 0.05; 0.10; 0.15; 0.20 mL; (a): $\lambda = 15 \text{ nm}$; (b): $\lambda = 60 \text{ nm}$

2.4 卟啉化合物对 BSA 构象的影响

使激发波长和发射波长的间距固定为 $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 15 \text{ nm}$ ，同步扫描激发和发射单色器可得到同步荧光光谱。蛋白质的同步荧光光谱已被用来判断蛋白质的构象变化。对于蛋白质的同步荧光光谱， $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 15 \text{ nm}$ 时仅显示蛋白质酪氨酸残基的光谱特征， $\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 60 \text{ nm}$ 时仅显示蛋白质色氨酸残基的光谱特征^[18]。因为氨基酸残基的最大荧光波长与其所处环境的疏水性有关，所

以由荧光波长的改变可判断蛋白质构象的变化^[19]。由图 5 可以看出，色氨酸残基的内源荧光强度明显大于酪氨酸残基，这表明蛋白质的内源荧光主要由色氨酸引起的。而且，色氨酸和酪氨酸残基的最大发射波长发生了红移，这表明 T(DB-HP)P 的加入使 BSA 的构象发生变化，BSA 内部的疏水结构有所破坏，肽链的伸展程度增加。

参 考 文 献

- [1] YU Tian-zhi, TAO Zu-yi(俞天智, 陶祖贻). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(3): 453.
- [2] Gharibi H, Javadian S, Hashemianzadeh M. Colloids and Surfaces A, 2004, 232: 77.
- [3] Ohyoshi E, Hamada Y, Nakata K, et al. Inorganic Biochemistry, 1999, 75: 213.
- [4] Guillaume Y C, Peyrin E, Berthelot A. Journal of Chromatography B, 1999, 728: 167.
- [5] Jiang C Q, Gao M X, Meng X Z. Spectrochim Acta Part A, 2003, 59: 1605.
- [6] Sun H Z, Szeto K Y. J. Inorganic Biochemistry, 2003, 94: 114.
- [7] CAO Xi-min, DU Li-ming(曹玺珉, 杜黎明). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(5): 973.
- [8] Wu D, Du B, Ma H M, et al. Spectroscopy Letters, 2006, 39: 399.
- [9] JIANG Zhi-qiang, CHI Yan-hua, ZHUANG Jia, et al(蒋志强, 迟燕华, 庄稼, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(5): 986.
- [10] FEN Xi-zeng, BAI Chur-li, LIN Zhang, et al(冯喜增, 白春礼, 林璋, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1998, 26(2): 154.
- [11] DUAN Cai-hong, CHEN Xin, SUN Shu-ting, et al(段彩虹, 陈欣, 孙舒婷, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(5): 969.
- [12] Burstein E A, Vedenkina N S, Ivkova M N. Photochemistry and Photobiology, 1973, 18: 263.
- [13] 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.
- [14] Ware W R. Journal of Physical Chemistry, 1962, 66(3): 455.
- [15] 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.
- [16] Cristobal G, Dos R, Pierre D J M. Journal of Structural Biology, 1995, 115: 175.
- [17] Ross D P, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096.
- [18] MA Chun-qi, LI Ke-an, ZHAO Feng-lin, et al(马春琪, 李克安, 赵凤林, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1999, 57(4): 389.
- [19] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Photochem. Photobio., 1973, 18: 26.

Study on Binding Mechanism of Meso-tetra-(3,5-Dibromo-4-Hydroxyphenyl) Porphyrin with Protein by Fluorescence Method

YAN Mei, CHEN Xin, SUN Shu-ting, MA Hong-min, DU Bin, WEI Qin*

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

Abstract Studies on the binding mechanism between protein and small molecules could give us lots of useful information. For example, a detailed characterization of drug-protein binding properties was essential for understanding the function of delivery, hence, interest in the mechanism of the interaction between them has attracted much research using different methods. In the present paper, the interaction mechanism between meso-tetra-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl) porphyrin [T(DB-HP)P] and bovine serum albumin (BSA) was investigated using fluorescence method. Based on the mechanisms of fluorescence quenching of BSA caused by T(DB-HP)P, the binding constants between T(DB-HP)P and BSA were measured at different temperatures. The experiment showed that T(DB-HP)P and BSA have strong interactions. The binding constants of the reaction at 27 and 48 °C were calculated by fluorescence method, respectively. The binding constants are $K = 1.30 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 27 °C, and $K = 6.32 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 48 °C. Because the binding constants decreased with increasing the temperature, the sort of quenching

between T(DBHP)P and BSA was determined as static quenching. By the theory of Förster non-radiation energy transfer, the binding distance and the energy transfer efficiency at 27 °C between T(DBHP)P (acceptor of energy) and BSA (donor of energy) were obtained to be 2.39 nm and 0.91, respectively. The binding distance was 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 T(DBHP)P and BSA could be judged as electrostatic force when $G < 0$, $H < 0$ and $S > 0$. Using the synchronous fluorescence spectra, the effect of T(DBHP)P on the conformation of BSA was studied. The results indicated that the conformation of BSA was changed when T(DBHP)P was added, and the hydrophobic properties of the environment of residues in BSA decreased. It was proved that fluorescence quenching of BSA was induced by static quenching and non-radiation energy transfer.

Keywords BSA; T(DBHP)P; Binding constants; Energy transfer; Mechanisms of fluorescence quenching; Synchronous fluorescence spectra

(Received Aug. 26, 2007; accepted Nov. 29, 2007)

* Corresponding author

中国化学会第 26 届学术年会 (第一轮通知)

中国化学会第 26 届学术年会定于 2008 年 7 月 13 ~ 16 日在天津举行。会议由中国化学会主办,南开大学承办,天津师范大学、天津理工大学协办。

大会主题:化学与和谐社会

会议内容包括:大会特邀报告、分会邀请报告、专题报告与讨论、论文墙报展讲,同时设置专题学术论坛。会议期间还将组织展览展示。欢迎广大科技工作者积极参加,踊跃投稿。热烈欢迎相关企业、高校、科研院所利用此次契机,扩大影响,参与会展。

本次学术年设置绿色化学、环境化学、化学生物学等 20 个学术分会;专题论坛 1 个及新技术新仪器专场展示。其中分析化学为第 9 分会。

分析化学分会的征文范围

(1) 原子光谱分析方法;(2) 分子光谱分析方法;(3) 色谱法与分离技术;(4) 电分析化学与传感器;(5) 环境分析化学;(6) 生物分析化学;(7) 波谱法;(8) 质谱分析;(9) 分析仪器与联用技术。

征文联系及收集人:张毅

单 位:南开大学化学系

地 址:天津市卫津路 94 号

邮政编码:300071

电 话:022 - 23506075

电子信箱:nkgcms@gmail.com