Chinese Journal of Analytical Chemistry

DOI: 10.3724/SP. J. 1096.2010.01479

# 十溴联苯醚与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究

谢显传<sup>12</sup> 王晓蓉<sup>\*1</sup> 张幼宽<sup>12</sup> 郑建中<sup>12</sup> 吴颖欣<sup>1</sup> 薛银刚<sup>1</sup> (污染控制与资源化研究国家重点实验室,南京大学环境学院<sup>1</sup>,南京大学水科学研究中心<sup>2</sup>,南京 210093)

摘 要 在模拟生理条件下 采用荧光光谱法研究十溴联苯醚( Deca-BDE) 与牛血清白蛋白( BSA) 的相互作用。结果表明: Deca-BDE 对 BSA 的内源荧光有静态猝灭作用。Deca-BDE 与 BSA 在 277, 298 和 310 K 的结合常数分别为  $1.92\times10^5$ ,  $1.97\times10^5$  和  $2.16\times10^5$  L/mol。Deca-BDE 在 BSA 接近于色氨酸残基附近有 2 个结合位点。热力学参数表明,Deca-BDE 与 BSA 相结合的主要驱动力是疏水作用力。与 Deca-BDE 结合后,BSA 色氨酸残基附近肽键伸展程度增加,蛋白分子结构疏松。

关键词 十溴联苯醚; 牛血清白蛋白; 荧光光谱

### 1 引 言

多溴联苯醚(PBDEs) 由于具有阻燃效率高、价格便宜及对材料性能影响小等优点,常被加入树脂、聚苯乙烯、聚氨酯泡沫等高分子合成材料中作为阻燃添加剂 在纺织、建材、交通工具和电子等领域广泛应用<sup>[1,2]</sup>。2001 年全球 PBDEs 产量已达 6.7 万吨,其中十溴联苯醚(Decabromodiphenyl ether, DecaBDE) 占 PBDEs 总量的 80%以上<sup>[1]</sup>。2001 年我国十溴联苯醚(Deca-BDE)的销售量已达 1.35 万吨<sup>[3]</sup>。由于不是以化学键与本体材料结合,PBDEs 很容易从产品中释放出来进入环境。目前全球 PBDEs 污染非常普遍 随处可检测出 PBDEs 甚至在北极地区也能检测到<sup>[4]</sup>。由于化学结构与多氯联苯(PCBs)类似,PBDEs 的亲脂性强,在环境中持久稳定,易在生物体内富集,可通过食物链产生生物放大效应,危害高营养级的生物<sup>[5]</sup>。有研究表明,PBDEs 会干扰生物体的甲状腺激素水平,影响生物神经系统的正常发育。此外,PBDEs 还表现有肝毒性、肾毒性、生殖毒性及致癌性<sup>[6,7]</sup>。

血清白蛋白是动物血浆中最重要的载体蛋白 ,是外源污染物在生物体内迁移的重要载体<sup>[18 9]</sup>。但是在生物体内血清白蛋白如何与 PBDEs 相互作用以及它们如何运载 PBDEs 还不甚清楚 ,也未见相关的研究报道。因此 ,本实验在模拟生理条件下研究 Deca-BDE 与牛血清白蛋白( BSA) 的相互作用 ,对了解 Deca-BDE 在生物体内的迁移转化、生物致毒机理等具有重要意义。

# 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

F-700 型荧光光谱仪(日本日立公司); Millipore Q 超纯水系统。牛血清白蛋白(BSA Fluka 公司), 十溴联苯醚(Deca-BDE Sigma-Aldrich 公司) 其它试剂均为国产分析纯。

#### 2.2 实验方法

- **2.2.1** 溶液配制 以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(含 0.1 mol/L NaCl, pH = 7.4) 为溶剂,配制 4.0 μmol/L BSA 溶液,置于 4 ℃ 冰箱中保存。以二甲亚砜(DMSO) 为助溶剂,先溶解十溴联苯醚(Deca-BDE) 再用上述的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液配制成 10 μmol/L Deca-BDE 溶液, 室温放置。
- **2.2.2** 荧光光谱测定 在 10~mL 玻璃试管中依次加入 2~mL  $4.0 \times 10^{-6} \text{mol/L}$  BSA 溶液、1~mL 不同浓度 Deca-BDE 稀释液和 1~mL 含不同浓度二甲亚砜( DMSO) 的磷酸盐缓冲液 ,混匀。为避免助溶剂的影响 需保证每试管的反应液中二甲亚砜( DMSO) 含量一致。 $1~\text{cm} \times 1~\text{cm}$  荧光比色皿 ,荧光扫描的固定激发波长为 280~nm 激发和发射通带均为 5~nm 扫描  $300 \sim 450~\text{nm}$  的荧光光谱。同步荧光光谱扫描测

<sup>2010-03-10</sup> 收稿; 2010-05-08 接受

本文系国家重点基础研究发展计划"973"项目(No. 2009CB421604)资助

<sup>\*</sup> E-mail: ekxr@ nju. edu. cn

定时固定激发和发射波长间隔  $\Delta\lambda$  分别为 15 和 60 nm。

# 3 结果与讨论

#### 3.1 Deca-BDE 与 BSA 的荧光猝灭光谱

由于含有荧光芳香族氨基酸(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸) 蛋白质具有内源荧光<sup>[10]</sup>。图 1 表明 激发波长为 280 nm 时, BSA 的最大荧光发射峰为 340 nm。固定 BSA 浓度,随着 Deca-BDE 浓度的增加, BSA 340 nm 处的内源荧光强度表现出有规律地降低,最大荧光发射的峰位有轻微的蓝移现象,而它的发射峰峰形基本保持不变。这说明 Deca-BDE 对 BSA 能产生有规律的荧光猝灭作用,由此可判断二者发生了相互作用。在激发波长为 280 nm 时,实验测定 Deca-BDE 无荧光响应,因此可完全忽略内滤光效应。

#### 3.2 Deca-BDE 对 BSA 荧光猝灭机理

荧光猝灭可分为动态猝灭作用和静态猝灭作用。动态荧光猝灭是指猝灭剂分子与荧光分子在分子运动发生碰撞而引起荧光猝灭;静态猝灭是指猝灭剂与荧光体相互结合生成无荧光特性的复合物而造成荧光猝灭。可分别用动态猝灭结合常数  $K_{\rm sv}$ 和静态结合常数 K 来描述荧光体与猝灭剂之间相互作用的程度和猝灭作用的性质。动态猝灭受反应温度影响大。随着反应温度升高,分子运动加快、动态猝灭加剧。各类猝灭剂的最大动态猝灭常数为  $2.0 \times 10^{10}$  L/(  ${\rm mol} \cdot {\rm s}$ ) 。与动态猝灭相比、荧光静态猝灭受反应温度影响较小 ${\rm [II]}$  。

动态猝灭是猝灭剂和荧光体激发态分子之间 <sup>4</sup> 的相互作用过程,其作用过程遵循 Stern-Volmer 方程:

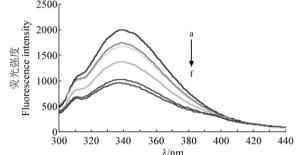


图 1 十溴联苯醚对 BSA 荧光光谱影响

Fig. 1 Effect of decarbromodiphenyl ether ( Deca–BDE) on florescence spectra of bovine serum albumin ( BSA)  $T=298~{\rm K}~, \lambda_{\rm ex}=280~{\rm nm}~, {\rm pH}~7.4~, {\rm a.}~2.0\times10^{-6}\,{\rm mol/L}~{\rm of}~{\rm BSA};$  b – f.  $2.0\times10^{-6}\,{\rm mol/L}$  of BSA in the presence of 2 , 4 , 6 , 8 , 10  $\mu$ mol/L of Deca–BDE , respectively.

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

其中  $F_0$  和 F 分别表示无猝灭剂和有猝灭剂时 BSA 的荧光强度,[Q]为猝灭剂即 Deca-BDE 的浓度, $K_{\rm sv}$ 为荧光动态猝灭常数, $K_{\rm q}$  为荧光动态猝灭速率常数, $\pi_0$  为无猝灭剂时荧光分子的平均寿命(约  $10^{-8}$  s)。本研究分别测定了 277 298 和 310 K 条件下 Deca-BDE 对 BSA 的荧光猝灭作用。假设 Deca-BDE 对 BSA 为动态猝灭 则采用 Stern-Volmer 方程进行数据处理可得荧光动态猝灭常数(表 1)。由表可得,Deca-BDE 对 BSA 在 277 298 和 310 K 时的荧光猝灭速率常数  $K_{\rm q}$  分别是  $1.37\times10^{13}$  , $1.31\times10^{13}$  和  $1.62\times10^{13}$  L/(  ${\rm mol}$  • s),远大于最大动态猝灭常数为  $2.0\times10^{10}$  L/(  ${\rm mol}$  • s),并且温度对  $K_{\rm q}$  值影响是不很明显,这都说明 Deca-BDE 对 BSA 的荧光猝灭是静态猝灭而非动态猝灭。

表 1 十溴联苯醚对牛血清白蛋白的荧光动态猝灭常数

Table 1 Florescence dynamic quenching constants between Deca-BDE and BSA

温度 Temperature (K)	动态猝灭常数 K <sub>SV</sub> Stern-Volmer dynamic quenching constant ( L/mol)	双分子猝灭速率常数 K <sub>q</sub> Bimolecule quenching rate constant L/( mol • s)	相关系数 Correlation coefficient ( r)
277	137396	$1.37 \times 10^{13}$	0.801
298	130952	$1.31 \times 10^{13}$	0.834
310	162356	$1.62 \times 10^{13}$	0.809

#### 3.3 Deca-BDE 与 BSA 的结合常数及结合位点数

若 DECA-BDE 在 BSA 上有 n 个相同且独立的结合位点 "那么 DECA-BDE 与 BSA 的关系可由荧光 物质-猝灭剂间的结合表达式为:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = n \lg K - n \lg \left( \frac{1}{[Q]} - \frac{(F_0 - F) [P]}{F_0} \right)$$
 (2)

其中, $F_0$ 和 F分别表示无猝灭剂和有猝灭剂时 BSA 的荧光强度,[Q]为猝灭剂即 DECA-BDE 的浓度,[P]为 BSA 的浓度 K 为结合常数 n 为结合位点数  $P_0$  。根据公式(2),以  $P_0$  以  $P_0$  为纵坐标,以  $P_0$  以  $P_0$  ( $P_0$  —  $P_0$  ),为横坐标作图,即可求出 DECA-BDE 与 BSA 的结合常数及结合位点数  $P_0$  表  $P_0$  。从表  $P_0$  可见,Deca-BDE 与 BSA 的结合常数在  $P_0$  的影响不大,进一步验证 Deca-BDE 对 BSA 的荧光猝灭是一静态过程。

表 2 十溴联苯醚与牛血清白蛋白结合常数及结合位点数和热力学参数

Table 2 Binding constant, sites and thermodynamic parameters between DECA-BDE and BSA

温度 Temperature ( K)	结合常数 <i>K</i> Binding constant ( L/mol)	结合位点数 <i>n</i> Binding sites	相关系数 Correlation coefficient ( r)	反应焓变 ΔH ( kJ/mol)	自由能变 ΔG ( kJ/mol)	熵变 ΔS [J/( K・mol) ]
277	1.92 × 10 <sup>5</sup>	1.85	0.986	0.87	-28.02	104.28
298	$1.97 \times 10^{5}$	1.99	0.970	5.80	-30.21	120.82
310	$2.16 \times 10^5$	2.09	0.978	2.53	-31.66	123.44

#### 3.4 Deca-BDE 与 BSA 的相互作用力类型

有机小分子与生物大分子之间非共价作用力主要有疏水力、氢键、范德华力及静电引力等类型,非共价作用力类型一般可通过热力学规律来确定。当  $\Delta H > 0$  且  $\Delta S > 0$  时,疏水力起主要作用;当  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S < 0$  时,氢键或范德华力起主要作用;当  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S > 0$  时,静电引力起主要作用力[13,14]。 根据以下 3 个热力学公式:  $\ln(K_2/K_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R$ , $\Delta G = -RT \ln K$ , $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$ ,可分别计算出 DECA-BDE 与 BSA 的反应焓变  $\Delta H$ 、自由能变  $\Delta G$  和熵变  $\Delta S$ 。由表 2 可见,Deca-BDE 与 BSA 结合反应的  $\Delta G < 0$ ;  $\Delta H > 0$ ;  $\Delta S > 0$ ,说明二者相互作用是一个自发的吸热过程,也是一个熵增过程。 因此可判断 Deca-BDE 与 BSA 的相互作用力主要是疏水作用力。

#### 3.5 Deca-BDE 对 BSA 分子构象的影响

由于蛋白质中 3 种荧光芳香族氨基酸的荧光光谱发射峰严重重叠 ,常规荧光扫描光谱难以把它们的特征光谱区分,需采用同步荧光光谱扫描。同步荧光光谱是指固定激发波长与发射波长的间距  $\Delta\lambda$ ,同时扫描激发波和发射波所测的扫描光谱,它可提供荧光发射基团附近微环境的变化信息。由  $\Delta\lambda=15~\mathrm{nm}$  和  $\Delta\lambda=60~\mathrm{nm}$  所得同步荧光光谱分别是蛋白质中酪氨酸(  $\mathrm{Tyr}$ ) 和色氨酸(  $\mathrm{Trp}$ ) 残基的光谱特征 [15,16]。由图 2 可见 随着  $\mathrm{Deca-BDE}$  浓度增大,酪氨酸残基在最大荧光发射波长 270 nm 附近的荧光强度变化不明显,最大发射波长无漂移现象。但 300~450 nm 区间的荧光强度显著激活升高( 图 2A);

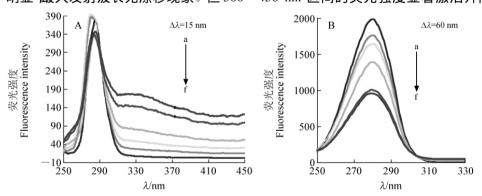


图 2 酪氨酸(a) 和色氨酸(b)的同步荧光光谱

Fig. 2 Synchronous fluorescence spectra of tyrosine (a) and tryptophan (b)  $T = 298 \, \text{K}$ , pH 7.4, a. 2.0  $\mu$ mol/L of BSA; b ~ f. 2.0  $\mu$ mol/L of BSA in the presence of 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ mol/L of Deca-BDE, respectively

色氨酸残基的荧光强度表现出有规律性降低,最大荧光发射波长未发生漂移(图 2B)。这表明 Deca-BDE 与 BSA 的结合位点接近于色氨酸残基部位,结合后色氨酸残基附近的微环境变化不显著,但是引起酪氨酸残基周围亲水性增强,肽键伸展程度增加,蛋白结构变疏松。

#### References

- 1 de Wit C A. Chemosphere , 2002 , 46(6): 583 ~ 624
- 2 Rahman F, Langford K H, Scrimshaw M D, Lester J N. Sci. Total Environ. , 2001, 275(1-3): 1 ~17
- 3 DU Hong-yan(杜红燕), ZHU Lin(朱琳), CHEN Zhong-Zhi(陈中智), LI Yan(李燕), DUAN Zheng-Hua(端正花). Chinese Journal of Toxicology(毒理学杂志), 2008, 22(1): 50~52
- 4 Ikonomou M G , Rayne S , Addison R F. Environ. Sci. Technol. , 2002 , 36(9): 1886 ~1892
- 5 TRI , Toxics Release Inventory (TRI) Program , US-EPA , http://www.epa.gov/tri/(acessed 2007)
- 6 WHO, Environmental Health Criteria 162: Brominated Diphenyl Ethers; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2004
- 7 Talsness C E. Environmental Research , 2008 , 108(2): 158 ~ 167
- 8 WU Qiu-Hua(吴秋华), WANG Dong-Yue(王跃东), WANG Zhi(王志). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(7): 1911~1914
- 9 ZHOU Neng( 周 能), LIANG Yi-Zeng( 梁逸曾), WANG Ping( 王 平). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2008, 36(8): 1066~1067
- 10 GUO Wei(郭维), ZHENG Lü-Yin(郑绿茵), WU Yong-Quan(吴勇权), XU Li-Rong(许丽荣), FAN Xiao-Lin(范小林), Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2008, 36(3):1066~1067
- 11 SUN Yan-Tao(孙艳涛), ZHANG Yu-Pu(张玉璞), BI Shu-Yun(毕淑云), SUN Ye(孙悦), LIU He(刘贺), ZHAI Yu-Juan(翟玉娟), ZHANG Han-Qi(张寒琦). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报) **2009**, 30(8): 1095~1100
- 12 LIANG Yan-Qiu(. 梁彦秋), ZHANG Shu-Liang(臧树良), DENG Bin(邓斌). Chinese Journal of Analysis Laboratory (分析试验室), 2009, 28(3): 74~77
- 13 Ross P D , Subramanian S. *Biochemistry* , **1981** , 20(11): 3096 ~ 3102
- 14 Timasheff S N , Peeters H (Ed.) . Protein of Biological Fluids , Pergamon Press , Oxford , 1972: 511 ~519
- 15 WANG Chun(王春), WU Qiu-Hua(吴秋华), WANG Zhi(王志). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(12): 2498
- 16 ZHANG Gen-Cheng(张根成), FAN Su(范 芬). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 2009, 25(7): 1199~1204

# Interaction of Decabromodiphenyl Ether with Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy

```
XIE Xian-Chuan<sup>1 2</sup> , WANG Xiao-Rong<sup>* 1</sup> , ZHANG You-Kuan<sup>1 2</sup> , ZHENG Jian-Zhong<sup>1 2</sup> ,

WU Ying-Xin<sup>1</sup> , XUE Ying-Gang<sup>1</sup>

( <sup>1</sup> State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse , School of the Environment ,

<sup>2</sup> Center for Hydrosciences Research , Nanjing University , Nanjing 210093)
```

Abstract The interaction between decabromodiphenyl ether ( Deca-BDE) and bovine serum albumin ( BSA) in physiological buffer was studied by fluorescence quenching technique. Results showed that Deca-BDE has strong quenching function for the intrinsic fluorescence of BSA through a static quenching procedure. The binding constants ( K) of Deca-BDE with BSA obtained by fluorescence quenching method were calculated to be 1.92 × 10<sup>5</sup>, 1.97 × 10<sup>5</sup> and 2.16 × 10<sup>5</sup> L/mol at 277, 298 and 310 K, respectively. The binding sites of Deca-BDE on BSA had two and both were near tryptophan sites. Thermodynamic parameters obtained from data at different temperatures showed that the binding of Deca-BDE to BSA involved hydrophobic bonds predominantly. The result of synchronous fluorescence spectra showed that binding of Deca-BDE with BSA could induce conformational changes in BSA.

Keywords Decabromodiphenyl ether; Bovine serum albumin; Fluorescence quenching