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  $1.92 \times 10^5$ ,  $1.97 \times 10^5$  和  $2.16 \times 10^5$  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>[12]</sup>。2001年全球 PBDEs 产量已达 6.7万吨,其中十溴联苯醚(Decabromodiphenyl ether, Deca-BDE)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>[67]</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 × 10<sup>-6</sup> 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 cm × 1 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 ~ 450 nm 的荧光光谱。同步荧光光谱扫描测

\* E-mail: ekxr@ nju. edu. cn

<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

定时固定激发和发射波长间隔 Δλ 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。 2500

#### 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<sub>sv</sub>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 × 10<sup>10</sup> L/(mol•s)。与动态猝 灭相比,荧光静态猝灭受反应温度影响较小<sup>[11]</sup>。

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 K ,  $\lambda_{\rm ex}=280$  nm , pH 7.4 , a. 2. 0 × 10  $^{-6}$  mol/L of BSA; b – f. 2. 0 × 10  $^{-6}$  mol/L of BSA in the presence of 2 , 4 , 6 , 8 , 10  $\mu$ mol/L of Deca-BDE , respectively.

$$F_0 / F = 1 + K_{\rm SV} [Q] = 1 + K_{\rm g} \tau_0 [Q]$$
(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,  $K_{sv}$ 为荧光动态猝灭常数,  $K_q$  为荧光动态猝灭速率常数,  $\tau_0$  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  $K_q$  分别是  $1.37 \times 10^{13}$ ,  $1.31 \times 10^{13}$  和  $1.62 \times 10^{13}$ L/(mol·s), 远大于最大动态猝灭常数为  $2.0 \times 10^{10}$ L/(mol·s),并且温度对  $K_q$  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。

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)	<b>双分子猝灭速率常数</b> 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				

#### 表1 十溴联苯醚对牛血清白蛋白的荧光动态猝灭常数

## 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<sup>[12]</sup>。根据公式(2),以 lg(( $F_0 - F$ )/F)为纵坐标, 以 lg(1/([Q] - ( $F_0 - F$ ) [P]/ $F_0$ ))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(表 2)。从表 2 可见, Deca-BDE 与 BSA 的结合常数在 10<sup>5</sup> L/mol 数量级以上 结合位点数约为 2, 说明 Deca-BDE 与 BSA 形成较稳定的 2 + 1 复合物。温度对结合常数(K)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 K Binding constant (L/mol)	结合位点数 n Binding sites	相关系数 Correlation coefficient (r)	反应焓变 ∆H ( kJ/mol)	自由能变 ΔG ( kJ/mol)	熵变 ΔS [J/(K・mol)]
277	$1.92 \times 10^{5}$	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  $\Delta H > 0 \pm \Delta S > 0$ 时,疏水力起主要作用;当  $\Delta H < 0 \pm \Delta S < 0$ 时,氢键或范德华力起主要作用;当  $\Delta H < 0 \pm \Delta S > 0$ 时,氯水力起主要作用;当  $\Delta H < 0 \pm \Delta S > 0$ 时,氢键或范德华力起主要作用;当  $\Delta H < 0 \pm \Delta S > 0$ 时,静电引力起主要作用力<sup>[13,14]</sup>。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 nm 和  $\Delta\lambda$  = 60 nm 所得同步荧光光谱分别是蛋白质中酪氨酸(Tyr) 和色氨酸(Trp) 残基的光谱特征<sup>[15,16]</sup>。由图 2 可见 随着 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 = 298K , 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(范苏). 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 $^1\,$  , XUE Ying–Gang  $^1$ 

(<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  $1.92 \times 10^5$ ,  $1.97 \times 10^5$  and  $2.16 \times 10^5$  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

(Received 10 March 2010; accepted 8 May 2010)