

2, 7-二氯荧光素与蛋白质相互作用的 分光光度法研究

罗英^① 何冀川 万怀龙

(绵阳师范学院组织部 四川省绵阳市 621000)

摘 要 首次采用分光光度法研究了模拟生理条件(pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液, 离子强度 $I=0.1$) 下 2, 7-二氯荧光素与牛血清白蛋白(BSA)相互作用的情况。研究表明: 两者相互作用形成稳定的复合物, 最大吸收波长为 509nm, 与 2, 7-二氯荧光素的最大吸收波长 502nm 比较, 红移了 7nm; 两者之间主要通过静电引力结合, 但并不排除疏水作用力和氢键; 两者之间的结合数为 32。

关键词 2, 7-二氯荧光素, 蛋白质, 分光光度法, 相互作用。

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2006)05-1099-04

1 前言

蛋白质是生物体中非常重要的成分, 任何动植物细胞内均有存在, 它是塑造一切细胞和组织的基本材料, 对其进行研究是一项十分重要且有意义的基础工作, 是分子生物学和生命科学研究的重要内容。随着分析仪器的不断改进, 研究蛋白质与药物分子相互作用的方法发展迅速^[1], 许多以前不能进行该领域研究的方法也开始在蛋白质与药物分子研究中发挥重要作用^[2]。目前主要的研究方法有较成熟的、应用较早的方法(包括荧光及分光光度法、红外拉曼光谱法、圆二色谱法等)、平衡透析法、超滤、电泳及色谱等方法, 还有新出现的激光散射等新的研究方法, 主要研究的模型蛋白为血清蛋白与血浆蛋白, 包括人血清白蛋白与牛血清白蛋白、酸糖蛋白以及人体免疫球蛋白等。其中, 光谱法由于分析方法简单、容易操作等优点仍然是蛋白质与药物分子研究中的主要方法, 在研究蛋白质与药物分子相互作用中应用广泛^[3]。通过光谱法研究可得到许多关于蛋白质与药物分子作用的信息, 包括结合常数、结合位点数、结合位置、作用力类型以及蛋白质分子在相互作用中结构的变化等有用的信息。

荧光素在近年来已得到广泛应用, 科研工作者常根据荧光素与蛋白质的相互作用建立测定蛋白质的分析方法^[4,5], 但未见研究 2, 7-二氯荧光素与牛血清白蛋白相互作用的报道。本文采用紫外可见分光光度法首次对 2, 7-二氯荧光素与牛血清白蛋白的相互作用进行了研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ZD-2 型自动电位滴定计(上海第二分析仪器厂), 78HW-恒温加热磁力搅拌器(杭州仪表电机厂), UV-2401PC 紫外光谱仪(日本 SHIMADZU 公司)。

牛血清白蛋白(BSA, 分子量按 65000 计, 购自上海伯奥生物科技有限公司), 用 pH 7.4 Tris-

① 联系人, 电话: (0816) 2203231; E-mail: luoy0509@yahoo.com.cn

作者简介: 罗英(1964—), 女, 四川省安县人, 绵阳师范学院副教授, 学士, 主要从事生物化学方面的教学和教研工作。

收稿日期: 2006-04-11; 接受日期: 2006-05-08

HCl 缓冲溶液配制其储备液($7.7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 4°C 保存于暗处; 2, 7-二氯荧光素(美国 Sigma 公司, 简称为 DCF), 储备液($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)用二次蒸馏水配制; 氯化钠(分析纯, $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液用于维持体系的离子强度; 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液(pH 7.4)用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷溶液和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液配制; 实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

于 10mL 比色管中, 依次加入 1.0mL $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液、1.0—4.0mL $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 7-二氯荧光素溶液、0.1—2mL $7.7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液, 用 pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度, 摇匀, 室温下静置 10min。以相应的试剂空白为参比, 室温下用 1cm 比色皿, 在一定波长下测定其吸光度。

(1) 固定 BSA 溶液浓度, 改变 2, 7-二氯荧光素的浓度, 在选定波长范围内扫描吸收光谱, 见图 1。

(2) 固定 2, 7-二氯荧光素溶液的浓度, 改变 BSA 溶液浓度。配制该系列溶液过程中发现: 随着 BSA 溶液浓度的增大, 溶液颜色由 2, 7-二氯荧光素的浅绿色, 逐渐过渡到桃红色。在选定波长范围内扫描吸收光谱, 见图 2。

3 结果与讨论

3.1 吸收光谱

图 1 为模拟生理条件下(pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液, 离子强度 $I = 0.1$) 2, 7-二氯荧光素对 BSA 吸收光谱的影响图。从图 1 中可以看出: BSA 在 400—750nm 波长范围内没有吸收, 随着 2, 7-二氯荧光素溶液浓度的增大, 吸光度值增大, 但谱线的形状基本保持不变, 最大吸收波长也无明显移动。因此, 不能说明 BSA 与 2, 7-二氯荧光素相互作用生成了复合物。因为吸光度的变化很可能是由于 2, 7-二氯荧光素浓度的不断增大而引起吸收程度的改变。为此, 实验过程中又固定 2, 7-二氯荧光素溶液的浓度、改变 BSA 溶液的浓度, 扫描混合物的吸收光谱图, 结果发现: BSA 的浓度为 $7.7 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时混合体系最大吸收波长发生了改变。据此, 本实验研究了 BSA 溶液的浓度为 $7.7 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与 DCF 的作用情况。

图 2 为模拟生理条件下 2, 7-二氯荧光素与 BSA 作用前后的吸收光谱图。从图 2 中可以看出: 2, 7-二氯荧光素的最大吸收波长为 502nm, 与 BSA 作用后最大吸收波长红移。由于 BSA 在该波段没有吸收, 2, 7-二氯荧光素的浓度变化只影响吸光度的变化, 而不会使最大吸收波长发生移动, 因此导致波长位移的因素只可能是 2, 7-二氯荧光素与 BSA 发生相互作用生成了复合物。

综上所述, 可得出结论: 2, 7-二氯荧光素与 BSA 在模拟生理条件下作用生成了复合物。由于在 BSA 的浓度为 $7.7 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与 DCF 反应后最大吸收波长红移到 509nm, 故在摩尔比法中

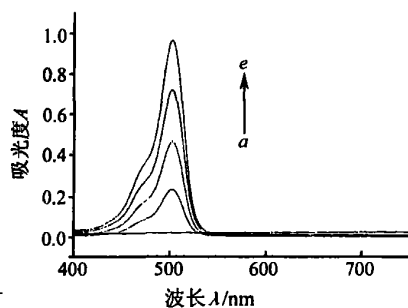


图 1 2, 7-二氯荧光素对 BSA 吸收光谱的影响

- a— $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白;
b— $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白 + $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 7-二氯荧光素;
c— $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白 + $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 7-二氯荧光素;
d— $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白 + $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 7-二氯荧光素;
e— $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白 + $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 7-二氯荧光素。

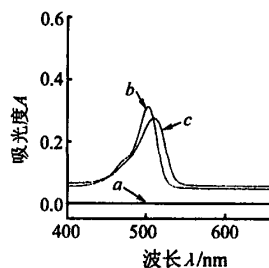


图 2 DCF 和 DCF-BSA 体系的吸收光谱图

- a—牛血清白蛋白的吸收光谱;
b—2, 7-二氯荧光素的吸收光谱;
c—牛血清白蛋白和牛血清白蛋白混合溶液的吸收光谱。

选择该波长为测定波长。

3.2 2, 7-二氯荧光素与 BSA 作用力类型及结合数的研究

有机小分子与蛋白质相互作用的研究主要包括以下内容: (1) 有机小分子与蛋白质相互作用的作用部位、作用力类型和有机小分子结合形态的研究; (2) 有机小分子与蛋白质相互作用的作用模型(Scatchard 模型、相分配模型、专一性结合模型、非专一性结合模型)研究及结合参数(结合个数和结合常数)的求算^[6]。本文主要讨论了 2, 7-二氯荧光素与 BSA 的作用位点、作用力类型及结合数的求算。

3.2.1 2, 7-二氯荧光素与 BSA 作用力类型的研究

药物等有机小分子和蛋白质等生物大分子常常借助于疏水作用力、静电引力、氢键和范德华力等结合形成超分子复合物^[7]。不同药物与蛋白质结合的作用力类型是不同的。大多数情况下, 有机小分子与蛋白质的相互作用是多种力协同作用的结果。本文吸收光谱部分已论述了 2, 7-二氯荧光素与 BSA 发生相互作用是由于生成了复合物, 这表明两者之间存在着作用力。从分子结构上看, BSA 分子中存在着不同基团, 如 $-H$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $>C=O$ 等, 2, 7-二氯荧光素存在着 $>C=O$ 、阴离子配体等。BSA 分子中的 $-H$ 与 2, 7-二氯荧光素的 $>C=O$ 之间可能形成氢键; 在水溶液中, BSA 中的 $-NH_3^+$ 与 2, 7-二氯荧光素的阴离子配体之间也可能存在静电引力; 还有两者含有一些极性很差、疏水性较强的基团间也可能靠疏水作用力结合。此外, 在实验过程中还发现: 配制系列不同浓度 BSA 溶液时, 由于 BSA 浓度的增大, 溶液颜色由浅绿色变成桃红色, 这种现象的产生说明静电引力在 BSA 与 2, 7-二氯荧光素的结合过程中起着关键作用^[8]。由此推测 2, 7-二氯荧光素与牛血清白蛋白主要靠静电引力结合, 但并不排除疏水作用力和氢键。

3.2.2 结合数的测定

许多有机小分子都能与蛋白质结合, 蛋白质上的主要结合位点可以结合多个有机小分子, 一个有机小分子可以结合在另一个已被结合的有机小分子上。为了定量研究有机小分子与蛋白质的作用, 本文采用摩尔比法测定了 2, 7-二氯荧光素与 BSA 相互作用的结合个数。

固定 BSA 浓度, 改变 2, 7-二氯荧光素的浓度, 在波长 509nm 处, 以试剂空白为参比, 测定吸光度值 A 。以吸光度值 A 对摩尔比作图, 见图 3。从图 3 中可以看出: 曲线中有折点出现。依据摩尔比法原理: 折点所对应的比值正对应于每一个 BSA 分子所结合的 2, 7-二氯荧光素分子的数目。图 3 中折点对应的值约为 32, 即是说每个 BSA 分子所结合的 2, 7-二氯荧光素分子的数目为 32。

4 结论

本论文采用紫外可见分光光度法对 2, 7-二氯荧光素与牛血清白蛋白相互作用进行了研究。模拟生理条件下, 2, 7-二氯荧光素与 BSA 作用后最大吸收波长发生红移, 实验结果说明 2, 7-二氯荧光素与 BSA 作用生成了复合物。该论文探讨了两者的作用力类型和作用位点, 并采用摩尔比法成功得到了两者相互作用的结合数为 32。

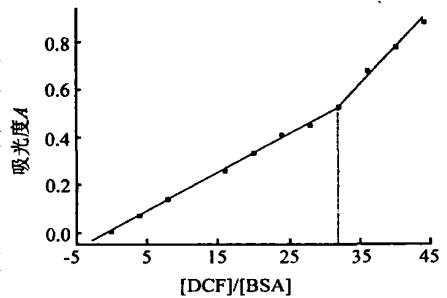


图 3 摩尔比法

[BSA]: $7.7 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda = 509 \text{ nm}$

参考文献

- [1] 王君, 任百祥. 药物与蛋白相互作用的分析测试[J]. 中国新医药, 2003, 2(5): 47—48.
- [2] Peters J A. *All About Albumin: Biochemistry Genetics and Medical Applications*[M]. San Diego: Academic Press, 1996.
- [3] 刘峥, 夏之宁. 光谱法在分子间相互作用中的应用[J]. 激光杂志, 2001, 22(6): 9—11.
- [4] 韩英强, 罗登柏, 詹国庆, 蓝贵金, 樊富. 血清蛋白与 4, 5-二溴荧光素相互作用及其分析应用的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(1): 35—36.
- [5] 王海人, 肖忠柏, 宋功武, 詹红菊. 荧光素与牛血清白蛋白作用的光谱研究与分析应用[J]. 分析测试学报, 2001, 20(4): 45—47.
- [6] 朱铿, 李娜, 李克安, 童沈阳. 蛋白质与有机小分反应机理的研究[J]. 化学试剂, 1999, 21(1): 17—21.
- [7] Soltes L, Mach M. Estimation of Drug-Protein Binding Parameters on Assuming the Validity of Thermodynamic Equilibrium [J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 768(1): 113—119.
- [8] 魏永巨, 李克安, 童沈阳. 埃铬青 R 与牛血清白蛋白的结合反应[J]. 分析化学, 1996, 24(10): 1175—1177.

Study on the interaction of 2, 7-Dichlorofluorescein with Protein

LUO Ying HE Ji-Chuan WAN Huai-Long
(Mianyang Teachers College, Mianyang, Sichuan 621000, P. R. China)

Abstract The intereaction of 2, 7-Dichlorofluorescein and bovine serum albumin (BSA) was investigated by the spectrophotometric methods under simulated physiological conditions. 2, 7-Dichloro-fluorescein interacts with BSA and forms a steady complex in Tris-HCl buffer of pH7. 4. The complex has a maximum absorption at 509nm with 7nm of red shift. The binding of BSA with 2, 7-Dichloro-fluorescein is mainly dominated by electrostatic forces, and other forces such as hydrogen bond and hydrophobic force. The binding number between 2, 7-Dichlorofluorescein and BSA is 32.

Key words 2, 7-Dichlorofluorescein, Protein, Spectrophotometry, Interaction.

关于赠送作者样刊和发放稿酬的通知

各有关作者:

从 2006 年第 1 期起, 本刊赠送作者发表自己论文的当期刊物(样刊), 均按篇赠送 2 本样刊, 用普通印刷品邮寄给作者联系人, 遗失不补(因系赠品)。若遗失或作者另有需要, 请在发表之日起 2 个月之内汇款购买(25 元/本, 免收挂号邮寄费), 逾期不再办理。

由于普通印刷品邮寄的送达时间不稳定, 若作者急需, 请预交特快专递费(30 元/件)。

给作者发放的稿酬均邮寄给联系人, 请各位联系人接到邮局通知后, 务必及时到邮局领取。若 2 个月未领, 被邮局退回, 本刊不再补发。

特此通知

《光谱实验室》编辑部

汇款购买地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 刘建林, 邮编: 100095