

对硝基苯酚与牛血清白蛋白相互作用的 荧光光谱研究

周磊 迟燕华 梁子卓 蒋志强^a 马萍

(西南科技大学材料科学与工程学院 四川省绵阳市 621010)

^a(攀枝花学院化学与生物工程系 四川省攀枝花市 617000)

摘 要 在模拟生理条件下应用荧光光谱和紫外-可见吸收光谱技术研究了牛血清白蛋白(BSA)与对硝基苯酚的相互作用。通过修正 Stern-Volmer 方程求出在不同温度下(304, 307, 310K)的淬灭常数为 $1.186, 1.030, 0.940 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 证实了 BSA 与对硝基苯酚相互结合作用为单一的静态猝灭过程, 并且得到对硝基苯酚与 BSA 相互作用的热力学参数 ΔH^0 和 ΔS^0 分别为 $-28.061 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $-14.331 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, 推出两者的相互作用以氢键为主。根据非辐射能量转移理论, 计算出对硝基苯酚与 BSA 相互结合时其供体-受体间的结合距离($r = 5.94 \text{ nm}$)和能量转移效率($E = 0.09$)。

关键词 对硝基苯酚, 牛血清白蛋白, 荧光光谱, 热力学参数。

中图分类号: O657.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2007)05-0757-05

1 前言

对硝基苯酚(*p*-Nitrophenol, PN P)大量存在于染料废水, 制革废料及汽车废气中。美国环境保护局和欧盟规定 PN P 在饮用水中的浓度不得超过 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ [1]。因此, 在过去几年的研究主要集中于 PN P 的处理[2]和 PN P 水污染的处理[3], 以及在生物体内的毒性机理和生物降解的研究[4,5]。迄今为止, 尚未见到应用荧光和紫外光谱法研究对硝基苯酚与血清白蛋白相互作用的报道。其结构式见图 1。

本文采用荧光光谱技术研究 PN P-BSA 分子间相互作用, 从多个角度对荧光淬灭类型予以判别, 运用 Stern-Volmer 修正方程得到静态淬灭常数; 由热力学方程推算得到分子间结合过程的热力学参数并由此推断出分子间作用的驱动力类型; 结合荧光光谱与紫外-可见吸收光谱得到分子间非辐射能量转移效率和分子间结合的空间距离; 通过同步荧光光谱和紫外-可见吸收光谱研究了 PN P 对 BSA 二级结构的影响。本文的研究对揭示毒性物质在体内蓄积、代谢及危害机理有着重要意义。

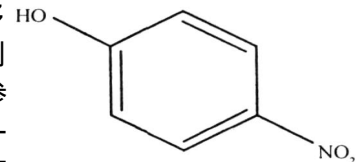


图 1 对硝基苯酚的分子结构式

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司); Cary-50 紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公

国家电分析化学重点实验室基金项目(2005007)

联系人, 电话: (0816) 6088656; E-mail: chiyanhua@swust.edu.cn

作者简介: 周磊(1982—), 男, 新疆五家渠市人, 硕士研究生, 方向: 生物大分子光谱分析。

收稿日期: 2007-05-09; 接受日期: 2007-06-01

司); 酸度计 868 型(美国 Thermo orion 公司); Heto-CBN 8-30 恒温制冷加热水浴(丹麦 Jouan Nordic A/S 公司)。

牛血清白蛋白(生化试剂, 上海丽珠东风生物技术有限公司, 分子量 67000) $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液, 置冰箱 273K-277K 保存; 对硝基苯酚(分析纯, 北京第一化学试剂厂) $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液; 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl) 缓冲溶液。其他化学试剂均为分析纯; 实验用水为蒸馏水。

2.2 实验方法

准确移取 1.0mL BSA ($1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、1.0mL NaCl ($1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 2.0mL Tris-HCl 缓冲溶液于 10mL 比色管中, 分别加入不同量的 PNP 溶液, 稀释至 10mL, 摇匀。在 304K 温度下扫描紫外-可见吸收光谱; 在 304, 307 和 310K 三种温度下, 固定荧光激发波长 280nm, 入射和出射狭缝均为 5.0nm, 扫描荧光光谱并测量荧光强度。

3 结果与讨论

3.1 荧光淬灭分析

BSA 的荧光主要来自色氨酸, 当 PNP 与 BSA 结合时, BSA 内在荧光强度的变化就是色氨酸残基荧光强度的变化。

图 2 为 PNP-BSA 体系的荧光光谱图。从图中可以看出, 激发波长为 280nm 时, BSA 在 345nm 处有较强的荧光, 而 PNP 则不发荧光。固定 BSA 浓度, 随着 PNP 浓度的增加, BSA 的荧光强度有规律性的降低, 这表明 PNP 与 BSA 发生相互作用。

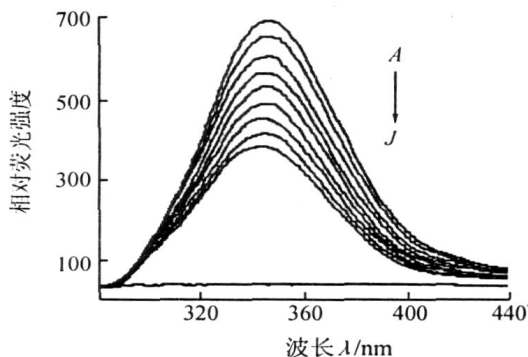


图 2 在不同浓度的 PNP 存在下对

$1.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 的荧光淬灭光谱

PNP 的浓度分别为: A — 0×10^{-5} ; B — 0.5×10^{-5} ;

C — 1.0×10^{-5} ; D — 1.5×10^{-5} ; E — 2.0×10^{-5} ;

F — 2.5×10^{-5} ; G — 3.0×10^{-5} ; H — 3.5×10^{-5} ;

I — 4.0×10^{-5} ; J — 单独的 PNP,

$C_{\text{PNP}} = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

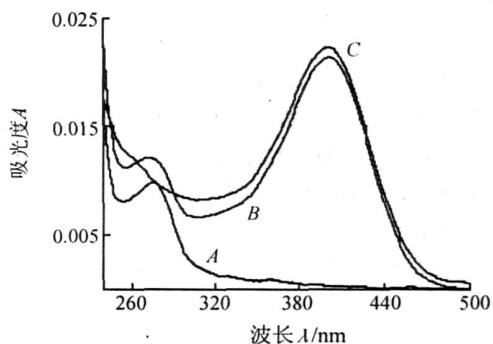


图 3 BSA, BSA-PNP, PNP 的紫外-可见吸收光谱

A — BSA; B — BSA-PNP; C — PNP;

A — $C_{\text{BSA}} = 1.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

B — $C_{\text{PNP}} = 1.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

$C_{\text{BSA}} = 1.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

C — $C_{\text{PNP}} = 1.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 淬灭机理

根据淬灭机理的不同可将淬灭分为动态淬灭和静态淬灭。动态与静态淬灭可以依据淬灭常数随温度的不同变化来区别。对于动态淬灭, 温度升高, 将增加有效碰撞, 使荧光物质的淬灭常数随着温度的升高而增大, 若是静态淬灭温度升高将降低复合物的稳定性, 使

表 1 不同温度下的 PNP-BSA 体系的淬灭常数

pH	T (K)	$10^4 K (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
7.40	304	1.186
	307	1.030
	310	0.940

淬灭常数减小。无论是静态淬灭还是动态淬灭, 荧光分子与淬灭剂之间的淬灭效率都遵循修正 Stern-Volmer 方程^[6]:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK[Q]} + \frac{1}{f} \quad (1)$$

式中: F_0 ——未加入淬灭剂时荧光物质的荧光强度; F ——加入淬灭剂时荧光物质的荧光强度; K ——修正 Stern-Volmer 淬灭常数; $[Q]$ ——淬灭剂的浓度; f ——蛋白质荧光体的荧光被淬灭的分数。利用 $F_0/(F_0 - F)$ 对 $1/[Q]$ 作图可得线性关系, 斜率—— $(1/fK)$, 截距—— $1/f$, 淬灭常数 K ——截距与斜率的商求得。

在不同温度下 (304K, 307K 和 310K) 计算得到的 K 值列于表 1。从表 1 中可以看出, 修正 Stern-Volmer 淬灭常数 K 随着温度的增加而减小, 符合静态淬灭的特征, 从而说明 PNP 对 BSA 的淬灭可能是由复合物的组成引起的。此时的淬灭常数可以看做是反应的结合常数。

为了进一步证实 PNP 对 BSA 的淬灭可能主要是由复合物的组成引起的这一结论, 对 BSA、BSA-PNP 和 PNP 分别进行了紫外-可见吸收光谱测定 (图 3)。从图 3 可以看出, BSA, PNP 和 PNP-BSA 的最大吸收波长各不相同。很明显, BSA 在 280nm 处有强吸收, PNP 在 400nm 处有吸收。当加入 PNP 后 BSA 的吸收峰出现蓝移现象。这一显著的变化表明, PNP 和 BSA 之间产生了复合物, 结果进一步证实了 PNP 对 BSA 的淬灭机理是一个静态淬灭过程。

3.3 结合反应的热力学参数和作用力类型分析

根据分子结构可知, 蛋白质与有机小分子之间的作用力应当属于分子间的弱相互作用, 包括氢键、范德华力、静电引力和疏水力。通过计算反应前后热力学参数焓变 ΔH^0 和熵变 ΔS^0 的相对大小, 可以判断有机小分子与蛋白质之间的主要作用力。为此, 当温度变化不大时, 反应的焓变 ΔH^0 可看做是一个常数。此时的熵变 ΔS^0 和焓变 ΔH^0 可通过范德霍夫方程 (式 2) 计算得出:

$$\ln K = -\Delta H^0 / RT + \Delta S^0 / R \quad (2)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (3)$$

式中 K 表示在相应温度下的淬灭常数, R 为气体常数。以 $\ln K$ 对 $1/T$ 作图, 由直线的斜率和截距可计算反应的熵变 ΔS^0 和焓变 ΔH^0 。再由式 3 计算结合反应的自由能变 ΔG^0 。

表 2 PNP 与 BSA 结合的热力学参数

温度 (K)	ΔH^0 (kJ · mol ⁻¹)	ΔG^0 (kJ · mol ⁻¹)	ΔS^0 (J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)
304		- 23 705	
307	- 28 061	- 23 662	- 14 331
310		- 23 619	

通过公式 2 和 3 计算出 ΔS^0 、 ΔH^0 和 ΔG^0 值列于表 2 中。从表 2 可以看出, 焓变 ΔH^0 和自由能变 ΔG^0 都是负值说明结合过程是自发的, 同时 BSA-PNP 复合物的组成是一个放热过程。PNP 与 BSA 作用过程中, 焓变 ΔH^0 (- 28 061 kJ · mol⁻¹) 和熵变 ΔS^0 (- 14 331 J · mol⁻¹ · K⁻¹) 都是负值说明了 BSA-PNP 之间的作用力是氢键和范德华力^[7]。在较高温度下, 蛋白质结合反应以焓驱动为主, 因此, 可以推断主要作用力为氢键, 范德华力有一定的作用。

3.4 结合距离及能量转移

根据非辐射能量转移理论^[8], 给体分子 (或基团) 与受体分子 (或基团) 之间发生非辐射能量转移必须满足下述三个条件: (1) 给体本身必须能发出荧光; (2) 给体的荧光光谱与受体的吸收光谱应该满足相当程度的重叠; (3) 给体与受体之间的距离能够靠近, 根据理论计算, 大约在 8nm 以内。BSA 中色氨酸的内源荧光很强, 测得 PNP 的紫外-可见吸收光谱与 BSA 的荧光光谱有部分重叠现象, 见图 4。

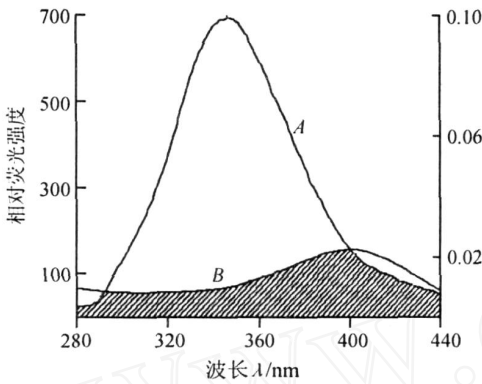


图 4 BSA 的荧光发射光谱(A)与 PNP 的吸收光谱 (B)的重叠谱 $C_{BSA} = C_{PNP} = 1.5 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

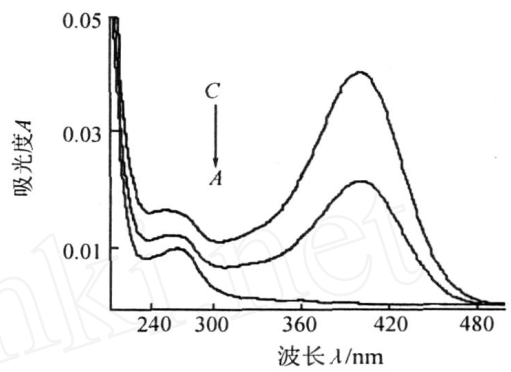


图 5 在不同浓度的 PNP 存在下对

$1.5 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 的紫外-可见吸收光谱图
PNP 的浓度分别为: A — $0 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
B — $1.5 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; C — $3.00 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

按照 Foerster 提出的偶极-偶极非辐射能量转移理论, 转移效率 E 与给体-受体间距离 r 及临界能量转移距离 R_0 有关:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (4)$$

其中, F —— 能量受体 (PNP) 和给体 (BSA) 浓度比为 1 : 1 时能量给体的荧光发射强度, F_0 —— 未加入受体 (PNP) 时给体的荧光强度, R_0 —— 能量转移效率为 50% 的临界距离:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \phi J \quad (5)$$

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (6)$$

式(6)中: $F(\lambda)$ —— 荧光给体 (BSA) 在波长为 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ —— 受体 (PNP) 在波长为 λ 的摩尔吸光系数。

式(5)中取向因子取供体-受体各向随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$, 折射指数取水和有机物的平均值 $n = 1.36$, BSA 中色氨酸残基的光量子产率 $\phi = 0.15$, BSA 荧光发射光谱与 PNP 吸收光谱的光谱重叠积分 $J = 2.02 \times 10^{-13} \text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。即可算出临界距离 $R_0 = 4.05 \text{nm}$, $r = 5.94 \text{nm}$, 能量转移效率 E 为 0.09, 推测 PNP 是在 BSA 的疏水腔中。

3.5 构象研究

图 5 是 BSA 与不同浓度 PNP 作用的紫外-可见吸收光谱。加入 PNP 后 BSA 的吸收峰 (280nm) 向短波方向移动。这一显著变化可表明, BSA 分子的肽链伸长, 疏水性降低。

当 $\Delta\lambda = 60 \text{nm}$ 时的同步荧光光谱只表现蛋白质的色氨酸残基的荧光。因色氨酸残基的最大发

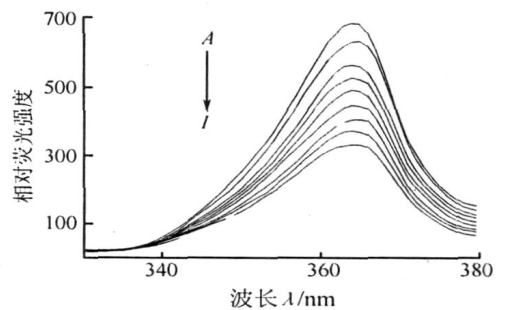


图 6 PNP 淬灭 BSA 的同步荧光光谱

(pH 7.40, $T = 304 \text{K}$, $\Delta\lambda = 60 \text{nm}$)

(A — I) $C_{BSA} = 1.5 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA;

$C_{PNP} = 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5$ 和 $4.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PNP

射波长与其所处环境的极性有关,因而由发射波长的改变可以判断蛋白质构象的变化。图 6 显示出色氨酸的最大发射波长发生了红移(从 362nm 到 364nm)。这说明 PN P 结合到 BSA 的色氨酸残基附近,导致 BSA 的结构松散,色氨酸残基周围的极性增加,疏水性降低。

参考文献

- [1] Mulchandani P, Lei Y, Chen W *et al* Microbial Biosensor for *p*-Nitrophenol using *Moraxella* sp [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2002, **470**(1): 79—86
- [2] Shen S F, Chang Z D, Liu H Z *et al* Three-Liquid-Phase Extraction Systems for Separation of Phenol and *p*-Nitrophenol from Wastewater[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2006, **49**(3): 217—222
- [3] Portela J R, Nebot E, Ossa E M. Kinetic Comparison between Subcritical and Supercritical Water Oxidation of Phenol[J]. *Chem. Eng. J.*, 2001, **81**(1—3): 287—299
- [4] TenBroek P L, Kendall S M, Tjeerdema R S. Toxicokinetics and Biotransformation of *p*-Nitrophenol in White Sturgeon (*Acipenser Transmontanus*) [J]. *Ecotox. Environ. Safe.*, 2006, **64**(3): 362—265
- [5] TenBroek P L, Kendall S M, Viant M R *et al* Toxicokinetics and Biotransformation of *p*-Nitrophenol in Red Abalone (*Haliotis Rufescens*) [J]. *Aquat. Toxicol.*, 2003, **62**(4): 329—333
- [6] Leher S S. Solute Perturbation of Protein Fluorescence Quenching of the Tryptophyl Fluorescence of Model Compounds and of Lysozyme by Iodide Ion [J]. *Biochem.*, 1971, **10**(17): 3254—3263
- [7] Ross D P, Subramanian S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability [J]. *Biochemistry*, 1981, **20**(11): 3096—3102
- [8] 徐同宽, 沈兴海, 高宏成. 表面活性荧光探针分子与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, **25**(9): 1443

Fluorescence Study on the Interaction of *p*-Nitrophenol with Bovine Serum Albumin

ZHOU Lei CHI Yan-Hua LIANG Zi-Zhuo JIANG Zhi-Qiang^a MA Ping

(College of Material Science and Engineering, Southwest University of Science

and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, P. R. China)

a(College of Chemistry and Biology Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, P. R. China)

Abstract The interaction of *p*-nitrophenol (PNP) with bovine serum albumin (BSA) was investigated by fluorescence and UV-visible absorbance spectroscopy under simulative physiological conditions. Fluorescence quenching of PNP to BSA was suggested as static quenching according to the modified Stern-Volmer equation. The thermodynamic parameters ΔH° ($-28.061 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) and ΔS° ($-14.331 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) were obtained, which indicated hydrogen bonds play an important role in stabilizing the complex. The distance (5.94 nm) between donor (BSA) and acceptor (PNP) was obtained according to fluorescence resonance energy transfer (FRET). The effect of PNP on the conformation of BSA has been analyzed by means of UV-visible absorption spectra and synchronous fluorescence spectra.

Key words *p*-Nitrophenol, Bovine Serum Albumin, Fluorescence Spectrometry, Thermodynamic Parameters