

荧光光谱法研究碳纳米管与牛血清白蛋白间相互作用

李杉杉¹, 何华^{1, 2*}, 陈喆¹, 查隽¹, Chuong Phanr Huy³

1 中国药科大学分析化学教研室, 江苏 南京 210009

2 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

3 Faculty of Pharmacy, University of Paris V; 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

摘要 作为一类新型的纳米材料, 碳纳米管(CNTs)所具有的独特结构、强细胞穿透能力和低免疫原性等特性引发了生物医学领域的广泛关注, 并有望作为一类新型的药物和基因转运载体。因此, 研究碳纳米管与生物大分子间的相互作用对其在体内的进一步应用具有极其重要的意义。本文运用荧光猝灭法、同步荧光法以及红边激发荧光位移法(REES法)研究了生理条件下碳纳米管与牛血清白蛋白(BSA)间的相互作用。结果表明, 碳纳米管可引起BSA内源性荧光的静态猝灭, 但同步荧光和REES的研究结果表明碳纳米管对BSA的构象基本没有影响。同时, 通过对碳纳米管与BSA相互作用的机制的探讨, 我们推测碳纳米管主要通过非特异性吸附的方式与BSA相互作用。

关键词 碳纳米管; 纳米药物载体; 牛血清白蛋白; 相互作用; 荧光光谱法

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)10-2689-04

引言

近年来, 纳米生物技术发展迅速, 成为纳米材料学和生物学各自学科的强势增长点。碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)是一种性能优良的纳米碳材料, 从1991年Iijima首次报道该纳米材料以来^[1], 人们就努力将它用于生物体系的研究。近年来, 碳纳米管的独特表面拓扑结构、化学组成和优异的物理性能已经吸引了众多领域的研究兴趣, 以生物医学应用为目标的探索性研究正在迅速形成一个新的方向^[2]。CNTs可通过形成稳定的共价键或形成以非共价键为基础的超分子结合物来运载肽类、蛋白质、核酸和药物等活性分子, 并将其运送至特定的组织、器官中以表达特殊的生物学功能^[3, 4], 作为高效率的细胞内药物运输载体在研制难以跨膜进入细胞的小分子药物^[5, 6]、多肽、蛋白质^[7]、DNA^[8, 9]等靶向药物输运系统方面具有应用前景。

药物载体的研究重点关注的是其治疗靶点的选择, 而生命过程又几乎都在生物大分子(包括蛋白质和核酸)的参与下进行的, 因此对药物载体作用机理的探索, 就必需深入了解其与蛋白质等生物大分子的相互作用关系。碳纳米管在水

液中的稳定分散和与蛋白质分子的作用是实现其生物医学应用的重要研究内容之一^[10, 11], 常涉及到纳米材料与蛋白质是否特异性作用等基础问题, 也辐射到纳米材料的生物安全性问题, 受到学术界和社会关注。目前有关药物小分子与生物大分子间相互作用研究已日趋成熟^[12-15], 而可能成为药物载体的碳纳米管与生物大分子相互作用方面的研究在国内外尚处起步阶段。本文运用荧光光谱法研究了碳纳米管与牛血清白蛋白间的相互作用, 并探讨了作用机制, 为碳纳米管这类新型纳米材料的临床应用及生物安全性评价提供参考。

1 试剂与仪器

多壁碳纳米管(外径10~20 nm, MWNT-1020, 深圳纳米港有限公司); 牛血清白蛋白BSA(组分V, 生化试剂, 南京大冶生物科技有限公司); 三羟甲基氨基甲烷(上海精细化工试剂有限公司); 其他试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

碳纳米管溶液配制: 精确称定10 mg的CNTs加入到10 mL的乙醇(分析纯)溶液中, 超声1 h以上充分分散。精密移取1 mL的CNTs乙醇溶液, 用Tris HCl缓冲溶液(pH 7.4,

收稿日期: 2009-11-18, 修订日期: 2010-02-22

基金项目: 中国药科大学科研经费项目资助

作者简介: 李杉杉, 女, 1984年生, 中国药科大学分析化学教研室研究生 e-mail: violet0569@sina.com

* 通讯联系人 e-mail: dochehua@163.com

含 NaCl 的浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀释至 10 mL, 配制成所需浓度的溶液备用。

RF5301 型荧光分光光度计 (日本岛津公司); UV2100 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司), pH S-25 型酸度计 (上海伟业仪器厂), BS 124S 型电子天平 (赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司)。其他玻璃仪器。

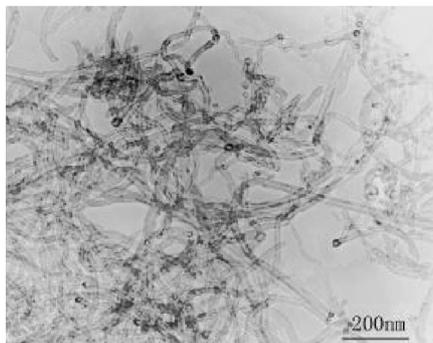


Fig 1 Photograph of SEM of MWNT 1020

2 实验方法

2.1 碳纳米管对牛血清白蛋白荧光的猝灭作用

将 BSA 溶解于 pH 为 7.4 的 Tris HCl 缓冲盐溶液 (缓冲液含 NaCl 的浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, 配制成浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。取 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液 3.0 mL 至 1 cm 荧光比色皿中。以 295 nm 为激发波长, 室温下测定上述 BSA 溶液的荧光光谱。随后向 BSA 溶液中依次加入 10 μL 的 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ CNTs 溶液, 在同样条件下测定其荧光光谱, 以空白 CNTs 溶液作对照。

2.2 同步荧光法研究碳纳米管对牛血清白蛋白构象的影响

在激发波长和发射波长的差值分别为 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 的条件下分别测定上述的 BSA 溶液的同步荧光光谱。依次加入 10 μL 的 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ CNTs 溶液, 在同样条件下测定同步荧光光谱。

2.3 REES 法研究 CNTs 对 BSA 色氨酸残基微环境流动性的影响

室温下测定上述 BSA 溶液在不同激发波长 (激发波长从 285 nm 逐渐增加至 300 nm) 下的荧光光谱。然后向 BSA 溶液中分别加入不同浓度的 CNTs 溶液, 在同样条件下测定荧光光谱。

3 结果与讨论

3.1 碳纳米管对牛血清白蛋白荧光的猝灭作用

CNTs 对 BSA 荧光强度的影响见图 2, 随着 CNTs 浓度增大, BSA 的荧光强度降低, 发生了明显的猝灭效应 (实验证明等量背景物质乙醇对体系荧光无影响)。数据经 Stern Volmer 方程处理^[16] [见图 3(a)], 线性拟合后得到猝灭常数 $K_{SV} = 1.042 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$, $r = 0.9981$ 。由于各种猝灭剂对生物大分子最大动态猝灭过程的猝灭常数都不大于 $0.2 \text{ L} \cdot$

mmol^{-1} , 而 CNTs 对 BSA 荧光的猝灭常数远大于此值, 因此我们推断 CNTs 对 BSA 荧光的猝灭属于因 CNTs 上的非特异性吸附效应而引发的相应复合物的静态猝灭。同时, 运用双波长法对 325 和 365 nm 两等波长点处的数据进行了处理 [见图 3(b)], 发现 F_L/F_R 值并无明显变化, 由此可见 CNTs 对 BSA 色氨酸残基的构象几乎不产生影响。

3.2 同步荧光法研究碳纳米管对牛血清白蛋白构象的影响

图 4(a) 和 (b) 分别为 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 条件下

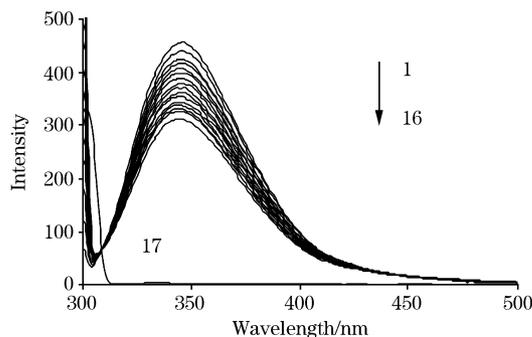


Fig 2 CNTs' influence on BSA fluorescence spectrum

$c(\text{CNTs})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1: 0; 2: 27.78; 3: 55.56; 4: 83.33; 5: 111.1; 6: 138.9; 7: 166.7; 8: 194.4; 9: 222.2; 10: 250.0; 11: 277.8; 12: 305.6; 13: 333.3; 14: 361.1; 15: 388.9; 16: 416.7; $c(\text{BSA}) = 5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 17: $c(\text{CNTs}) = 250.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{BSA}) = 0.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

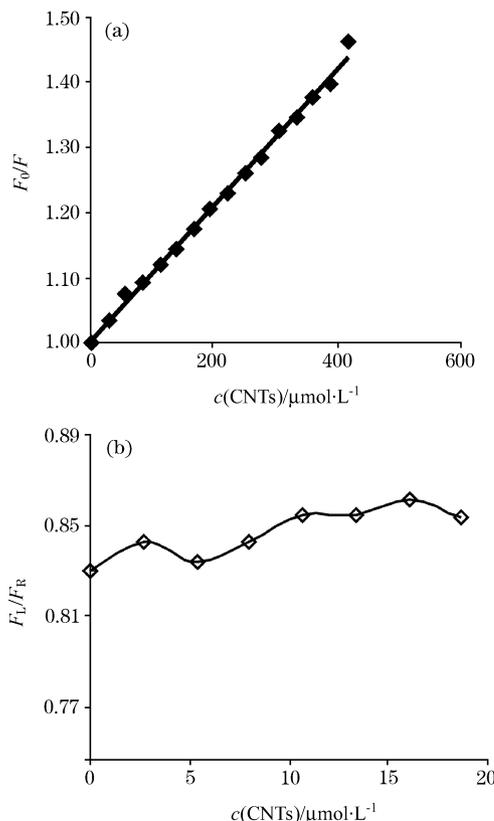


Fig 3 Stern Volmer plots for BSA fluorescence quenching by CNTs (a) the effect of CNTs on the position of λ_{ex} (b)

CNTs 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱图, 图 4 数据经 Stern Volmer 方程处理后得到图 5。图 4 中 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时的同步荧光光谱最大发射波长基本没有变化, 说明 CNTs 不会引发 BSA 的构象的变化。由图 5 可知, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时 CNTs 对荧光的猝灭作用很弱 ($K_{SV} = 0.4049 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$), 而 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时的猝灭作用较强 ($K_{SV} = 1.094 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$), 由此可推断 CNTs 对 BSA 酪氨酸残基的影响较弱, 其主要与色氨酸残基作用^[17]。

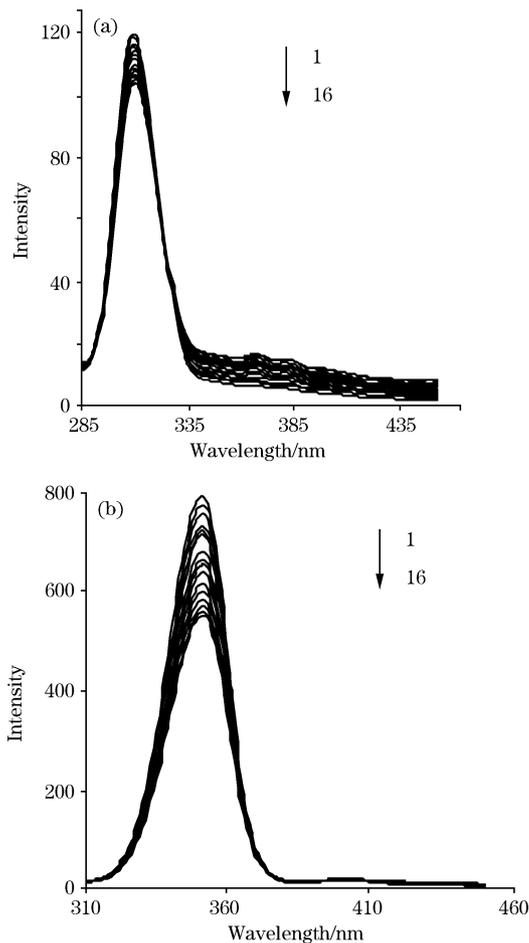


Fig 4 Effect of CNTs on the synchronous fluorescence spectra of BSA, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (a) and $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (b); $c(\text{CNTs})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1: 0; 2: 27.78; 3: 55.56; 4: 83.33; 5: 111.1; 6: 138.9; 7: 166.7; 8: 194.4; 9: 222.2; 10: 250.0; 11: 277.8; 12: 305.6; 13: 333.3; 14: 361.1; 15: 388.9; 16: 416.7; $c(\text{BSA}) = 5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3.3 REES 法研究 CNTs 对 BSA 色氨酸残基微环境流动性的影响

图 6 为 REES 法测定数据经双波长法处理后的结果。由图 6 可见, 随着激发波长的不断增加, BSA 的 F_L/F_R 值不断降低, 说明荧光谱线发生红移现象, 这表明 BSA 的色氨酸残基被置于一种运动受限的环境中。然而, 随着体系中加入 CNTs 浓度的增加, F_L/F_R 值降低程度基本保持不变, 说明

红移程度并无明显增加, 此现象说明 CNTs 对 BSA 色氨酸残基微环境的流动性基本不产生影响^[18]。

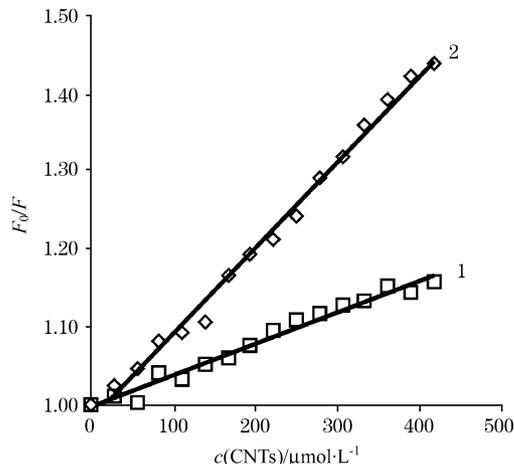


Fig 5 Stern Volmer plots for BSA synchronous fluorescence quenching by CNTs
1: $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$; 2: $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$

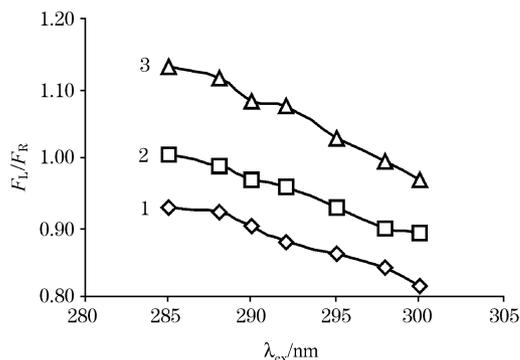


Fig 6 Effect of CNTs on the red edge excitation shift of BSA
1: $c(\text{CNTs}) = 0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2: $c(\text{CNTs}) = 138.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
3: $c(\text{CNTs}) = 277.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3.4 相互作用机制探讨

CNTs 中的碳原子以 sp^2 杂化作用为主, 其表面由大量芳香结构构成, 并且具有极大的比表面积, 运用荧光光谱法, 在生理条件下研究 CNTs 与 BSA 间的相互作用及其对 BSA 构象的影响发现: CNTs 可通过非特异性吸附的方式对 BSA 的内源性荧光产生显著静态猝灭作用, 且对 BSA 的构象基本没有影响。虽然 CNTs 的尺寸与蛋白质相似^[19], 但同步荧光的研究表明, CNTs 与 BSA 酪氨酸残基的作用较弱, 而其与色氨酸残基的作用较强。产生这种现象的原因可能是由于 CNTs 具有纳米管状结构, 表面无分支, 故其主要通过外壁的非特异性吸附与位于 BSA 表面的色氨酸残基相互作用, 因此其较难接触到位于 BSA 内部的酪氨酸残基, 故无法与 BSA 内部的酪氨酸残基结合。

4 结论

本文运用荧光光谱法, 在生理条件下研究了 CNTs 与

BSA 间的相互作用及其对 BSA 构象的影响。研究表明: CNTs 可通过非特异性吸附的方式对 BSA 的内源性荧光产生显著静态猝灭作用。通过同步荧光的研究,发现 CNTs 与 BSA 酪氨酸残基的作用较弱,而其与色氨酸残基的作用较强。产生这种现象的原因可能是由于 CNTs 的尺寸与蛋白质

相似^[7],故其只能与 BSA 表面的色氨酸残基作用,而无法与 BSA 内部的酪氨酸残基结合。同步荧光的最大发射波长基本没有发生变化,说明 CNTs 对 BSA 色氨酸残基微环境的构象基本无影响。此外,REES 法的研究结果也表明 CNTs 的加入对 BSA 色氨酸残基微环境的流动性基本不产生影响。

参 考 文 献

- [1] Iijima S. *Nature*, 1991, 354(6348): 56.
- [2] MENG Jie, SONG Li, KONG Hua, et al(孟洁,宋礼,孔桦,等). *Journal of Biomedical Engineering(生物医学工程学杂志)*, 2007, 24(1): 55.
- [3] Lara Lacerda, Simona Raffa, Maurizio Prato. *Nanotoday*, 2007, 2(6): 38.
- [4] LI Sharr shan, HE Hua, JIAO Qing cai, et al(李杉杉,何华,焦庆才,等). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2008, 20(11): 1798.
- [5] Wu W, Wieckowski S, Pastorin G, et al. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2005, 44: 6358.
- [6] Bianco A. *Expert Op. in Drug Deliv.*, 2004, 1(1): 57.
- [7] Kam N W, Liu Z, Dai H. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2006, 45: 577.
- [8] Singh R, Pantarotto D, McCarthy D, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 4388.
- [9] Kam N W, Liu Z, Dai H. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 12492.
- [10] MENG Jie, YANG Man, WANG Chaoying, et al(孟洁,杨曼,王超英,等). *New Carbon Materials(新型炭材料)*, 2007, 22(3): 218.
- [11] MENG Jie, SONG Li, KONG Hua, et al(孟洁,宋礼,孔桦,等). *Chinese J. Dial. & Artif. Organs(透析与人工器官)*, 2007, 16(3): 5.
- [12] Yang Yumin, Hu Qiuluan, Fan Yanli, et al. *Spectrochimica Acta Part A*, 2008, 69(2): 432.
- [13] Wang Nan, Ye Ling, Yan Fangfei, et al. *Pharmaceutics*, 2008, 351(1-2): 55.
- [14] HE Hua, YU Jur sheng, XU Sharr ping, et al(何华,于俊生,徐珊瑚,等). *Acta Pharmaceutica Sinica(药学报)*, 2001, 36(7): 549.
- [15] Wang Y Q, Zhang H M, Zhang G C. *Luminescenc*, 2007, 126(1): 211.
- [16] Zhang Yezhong, Xiang Xia, Mei Ping, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 72(4): 907.
- [17] Hu Yanjun, Yu Huaguan, Dong Jiaxin, et al. *Spectrochimica Acta Part A*, 2006, 65(3-4): 988.
- [18] Demchenko A P, *Trends Biochem. Sci.*, 1988, 13(10): 374.
- [19] El Sheikh Amjad H, Sweileh Jamal A, Al Degs Yahya S. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 604(2): 119.

Fluorescence Study on the Interactions between Carbon Nanotubes and Bovine Serum Albumin

LI Sharr shan¹, HE Hua^{1, 2*}, CHEN Zhe¹, ZHA Jun¹, Chuong Pharr Huy³

1. Division of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

3. Faculty of Pharmacy, University of Paris V, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Abstract As a new family of nanomaterials, carbon nanotubes (CNTs) exhibit unique properties such as their capacity to penetrate into the cells and low immunogenicity, which have attracted increasing attention in biomedical field and make their application in drug and gene transfer systems being possible. So getting more information about the interaction of CNTs with biomacromolecules is crucial for further investigation of CNTs in therapeutic applications. The interaction between CNTs and BSA under physiological condition was investigated by fluorescence quenching, synchronous fluorescence and red edge excitation shift (REES) method. The results showed that CNTs could significantly decrease the fluorescence intensity of BSA. While the results of synchronous fluorescence and REES indicated that CNTs almost had no influence on the conformation of BSA. So the authors concluded that the mechanism of interaction between CNTs and BSA was non specific adsorption.

Keywords Carbon nanotubes; Nanovectors; BSA; Interaction; Fluorescence spectroscopy

* Corresponding author

(Received Nov. 18, 2009; accepted Feb. 22, 2010)