

甲基百里酚蓝-铜(II) 络合物与 白蛋白的相互作用^①

丁飞^{②a,b} 宋卫堂^a 林娟^b 潘虹^a 高黎^a

^a(中国农业大学理学院 北京市海淀区圆明园西路 2 号 100094)

^b(中国矿业大学化工学院 江苏省徐州市解放南路 221008)

摘 要 在模拟动物体生理条件下, 采用荧光光谱、紫外-可见光谱法研究了甲基百里酚蓝-铜(II) 络合物与牛血清白蛋白(BSA) 的相互作用。实验表明, MTB-Cu(II) 络合物与 BSA 之间为一形成复合物的静态猝灭过程。根据 Stern-Volmer 方程和 Lineweaver-Burk 方程求出了其结合常数(295K: $3.449 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 310K: $2.792 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 和热力学参数($\Delta H = -10.71 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\Delta S = 69.69 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} / 69.71 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$; $\Delta G = -31.27 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} / -32.32 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), 证明二者主要以静电力作用, 该过程是一个熵增加、Gibbs 自由能降低的自发超分子过程。依据 Förster 理论求出了结合距离 $r = 2.25 \text{ nm}$, 阐明了猝灭机制是通过能量转移产生的。

关键词 甲基百里酚蓝-铜(II) 络合物, 牛血清白蛋白, 荧光光谱, 紫外-可见光谱。

中图分类号: O657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8138(2008)06-1099-05

1 前言

目前, 染料、药物等与蛋白质的作用已有较多报道^[1-4], 但有关染料-金属络合物与蛋白质相互作用的研究相对较少。甲基百里酚蓝(Methylthymol blue, 简称 MTB) 是三苯甲烷类染料, 常用作络合滴定指示剂。我国学者王兴明等^[5]用紫外-可见吸收光谱研究了 MTB-Zn(II) 络合物与牛血清白蛋白(BSA) 的相互作用, 但用荧光光谱法研究 MTB-Cu(II) 络合物与 BSA 的作用机理目前未见报道。

本实验用荧光光谱、紫外-可见光谱在模拟动物体生理条件下, 研究了 MTB-Cu(II) 络合物与 BSA 结合反应的光谱特征, 探讨了 MTB-Cu(II) 络合物对 BSA 的荧光猝灭作用, 求出了结合常数、结合位置、作用力类型、热力学参数等, 为进一步研究生物大分子 BSA 的结构、性质等提供了实验和理论根据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

RF-5301PC 型荧光分光光度计(日本 Shimadzu 公司), UV-2501PC 型紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司), pH S-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂), Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司), SYC-15 型超级恒温水浴(南京桑力电子设备厂)。

① 中国矿业大学科学研究基金资助项目(No. 2006B013)

② 联系人, 电话: (010) 62814084; E-mail: caudf@163.com

作者简介: 丁飞(1981-), 男, 江苏省扬州市人, 硕士, 主要从事生物分析化学研究。

收稿日期: 2007-11-13; 接受日期: 2008-10-06

牛血清白蛋白(美国Sigma公司)溶液: $6.7 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 甲基百里酚蓝(上海楷洋生物技术有限公司)溶液: $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CuCl_2 (北京华腾化工有限公司)储备液: $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所用试剂均为分析纯, 实验用水为Milli-Q超纯水, 经检测均无荧光杂质。

2.2 实验方法

在一系列10mL比色管中, 分别加入一定量的MTB($C_{\text{MTB}} = 0 \sim 3.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{Cu}(\text{II})$ 、BSA溶液, 以 $\text{pH} = 4.25$ 的Britton-Robinson缓冲溶液定容至刻度后摇匀, 恒温静置一定时间, 在RF-5301PC型荧光分光光度计上以 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 记录荧光发射光谱、同步荧光光谱, 在紫外-可见分光光度计上记录吸收光谱。

3 结果与讨论

3.1 三元体系的紫外-可见吸收光谱

图1所示为 $\text{pH} = 4.25$ 时体系的紫外-可见吸收光谱。由图1可见, MTB(曲线1)的最大吸收峰为436nm, MTB-BSA(曲线2)的最大吸收峰为438nm, MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ (曲线3)的最大吸收峰在448nm, 且在601nm处有微弱吸收, 而MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ -BSA(曲线4)的一个吸收峰在448nm处, 另外在611nm处出现了一个新的较强吸收峰, 同时在611nm处MTB、MTB-BSA、MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 吸收曲线的吸光度之和远小于MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ -BSA三元体系的吸光度, 此外, 与MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 吸收曲线相比, MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ -BSA曲线在448nm处有显著的减色效应, 因此, 体系中有MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ -BSA三元络合物形成。

3.2 MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 与BSA作用的荧光光谱

白蛋白分子中因含有色氨酸、酪氨酸等残基而产生较强的内源荧光, 图2是MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 络合物与BSA作用的荧光光谱。随着MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 络合物浓度的增加, BSA的荧光强度有规律地降低, 最大发射峰稍有蓝移, 说明MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 对BSA的内源荧光有猝灭现象, MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 与BSA之间存在相互作用。

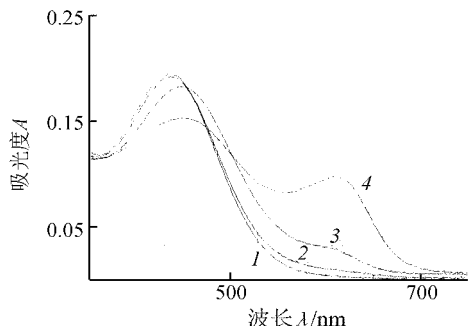


图1 紫外-可见吸收光谱

1—MTB; 2—MTB-BSA;

3—MTB- $\text{Cu}(\text{II})$; 4—MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ -BSA。

$C(\text{MTB}) = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C(\text{BSA}) =$

$1.34 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C(\text{Cu}^{2+}) = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

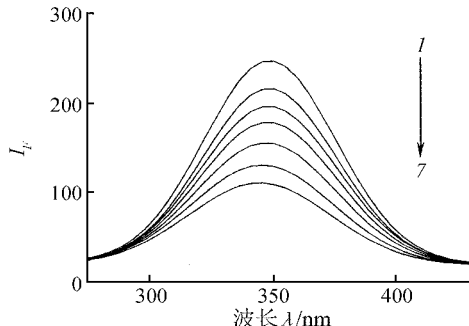


图2 MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 和BSA作用的荧光光谱

$C(\text{BSA}) = 6.7 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C(\text{MTB-Cu}(\text{II})) \times$

$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I \rightarrow 7: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 2.0, 2.4, 3.2$ 。

3.3 MTB- $\text{Cu}(\text{II})$ 与BSA的相互作用

荧光猝灭作用因机制不同分为动态猝灭、静态猝灭^[6]。动态猝灭遵循Stern-Volmer方程: $I_0/I_F = 1 + K_{\text{sv}}[C(Q)] = 1 + k_7 \tau_0 [C(Q)]$, 静态猝灭符合Lineweaver-Burk方程: $1/(I_0 - I_F) = 1/I_0 +$

$1/[K_{LB}I_F^0\{C(Q)\}]$ 。当温度分别为 295K、310K 时, 按照实验方法测出不同浓度 MTB-Cu(II) 络合物对 BSA 荧光强度的影响, 由实验数据作出体系的 Stern-Volmer 曲线和 Lineweaver-Burk 曲线(图 3、图 4), 并对实验数据线性拟合得到动态猝灭常数 K_{SV} 、静态猝灭常数 K_{LB} 等参数(表 1)。

表 1 结合反应常数

T/K	$10^5 K_{SV}/(L \cdot mol^{-1})$	$10^{13} k_q/(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	$10^5 K_{LB}/(mol \cdot L^{-1})$
295	5.676	5.676	3.449
310	4.518	4.518	2.792

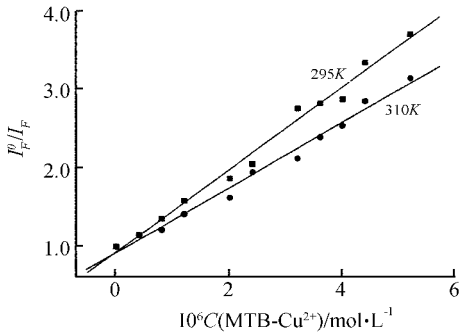


图 3 MTB-Cu(II) 对 BSA 的 Stern-Volmer 曲线

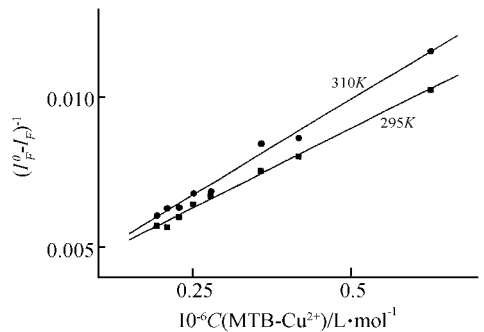


图 4 MTB-Cu(II) 对 BSA 的双倒数曲线

由表 1 可知, MTB-Cu(II) 络合物与 BSA 结合反应的 k_q 值远大于最大动态荧光猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, 表明 MTB-Cu(II) 对 BSA 内源荧光的猝灭过程不是由扩散和碰撞引起的动态猝灭, 而是形成复合物的静态猝灭过程。并且静态猝灭常数 K_{LB} 随温度升高而减小, 更进一步证明该过程是静态猝灭。

3.4 MTB-Cu() 与 BSA 的作用力类型

有机小分子和蛋白质等生物大分子之间的结合力主要有疏水作用力、静电力、氢键和 Van der Waals 力。当温度变化不大时, MTB-Cu(II) 络合物与 BSA 结合反应的焓变 ΔH 可看做常数, 根据热力学公式 $\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R - \Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K$ 求得 295K 时: $\Delta H = -10.71 kJ \cdot mol^{-1}$, $\Delta S = 69.69 J \cdot K^{-1}$, $\Delta G = -31.27 kJ \cdot mol^{-1}$; 310K 时: $\Delta H = -10.71 kJ \cdot mol^{-1}$, $\Delta S = 69.71 J \cdot K^{-1}$, $\Delta G = -32.32 kJ \cdot mol^{-1}$ 。根据 Ross 等^[7] 总结出的规律, MTB-Cu(II) 络合物与 BSA 之间以静电力作用为主, 该过程是熵增加、Gibbs 自由能降低的自发超分子作用过程。

3.5 MTB-Cu() 与 BSA 的作用距离

根据 Foerster 理论, 当给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱有足够的重叠, 并且给体与受体之间最大距离不超过 7nm 时, 发生非辐射能量转移现象, 导致荧光猝灭^[8]。本体系中 BSA 的荧光光谱和 MTB-Cu(II) 络合物的紫外-可见吸收光谱有很大程度的重叠, 见图 5。

将光谱重叠部分分割成极小的矩形, 求得光谱重叠积分 $J = 1.028 \times 10^{-14} cm^3 \cdot L \cdot mol^{-1}$, 临界距离 $R_0 = 2.56 nm$, 进而由杨频等^[9] 提出的方法, 求得

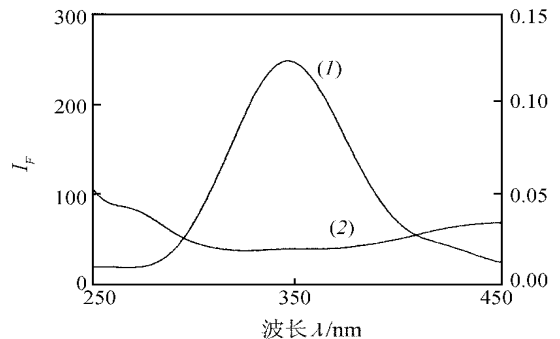


图 5 BSA 的荧光光谱(1)和 MTB-Cu(II) 的紫外-可见吸收光谱(2)

$$C(\text{BSA}) = 6.7 \times 10^{-6} mol \cdot L^{-1},$$

$$C(\text{MTB-Cu(II)}) = 6.7 \times 10^{-6} mol \cdot L^{-1}.$$

$E = 68.23\%$, 结合距离 $r = 2.25\text{nm}$ 。

BSA 的荧光主要来自第212位色氨酸残基, 该残基位于BSA 的疏水腔内, 所求得的 r 值为结合部位与该残基之间的距离, r 值小于 7nm , 符合Foerster 能量转移理论, 说明MTB-Cu(II) 络合物与BSA 之间存在非辐射能量转移。并且结合距离 r 小于能量转移效率为50%时的临界距离 R_0 , 说明非辐射能量转移引起蛋白质荧光发射峰猝灭的几率比静态猝灭的大^[10]。

3.6 MTB-Cu(II) 与 BSA 作用的结合常数

求取有机小分子和蛋白质分子结合常数 K_A 、结合位点数 n 的方法较多, 其中Scatchard 法是经典的方法, 但应用此法时必须已知实验中游离态有机小分子的浓度, 这个值往往很难知道, 目前一般用已知的有机小分子总浓度来代替, 因此就带来一定误差, 特别是对于与蛋白质结合较强的有机小分子而言, 结果将与实际情况相差较大^[11]。文献[12]提出了改进的公式:

$$\lg[(I_F^0 - I_F)/I_F] = n \lg K_A + n \lg \{C(D_i) - n\{C(P_i)\}(I_F^0 - I_F)/I_F^0\}$$

式中: $C(D_i)$ —— 溶液中有有机小分子的总浓度; $C(P_i)$ —— 蛋白质的总浓度。

根据这一公式, 以 $\lg[(I_F^0 - I_F)/I_F]$ 对 $\lg\{C(\text{MTB-Cu(II)}) - \{C(\text{BSA})\}(I_F^0 - I_F)/I_F^0\}$ 作图 (见图6) (假设上式中 $n = 1$), 可求得 MTB-Cu(II) 络合物与蛋白质分子 295K: $K_A = 11.75 \times 10^5 / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$, $n = 1.06$; 310K: $K_A = 7.137 \times 10^5 / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$, $n = 1.04$ 。MTB-Cu(II) 络合物与BSA 形成1:1 的三元复合物, 表观结合常数 K_A 在 10^5 数量级, 说明MTB-Cu(II) 与BSA 有强相互作用, 二者之间属于高亲合作用范畴^[13], 且 K_A 随温度升高而减小, 这是因为MTB-Cu(II)-BSA 复合物的稳定性随温度的升高而降低。

4 结论

MTB-Cu(II) 络合物对牛血清白蛋白的内源荧光有猝灭现象, 该过程是一个形成三元络合物的静态猝灭过程。通过计算热力学参数, 发现MTB-Cu(II) 络合物与白蛋白之间主要是以静电力相互作用, 熵增加是主要驱动力因素。根据Foerster 理论计算了MTB-Cu(II) 络合物与白蛋白的结合距离, 进一步说明猝灭过程主要是通过能量转移产生的。MTB-Cu(II) 络合物与白蛋白之间有强相互作用, 且MTB-Cu(II) 络合物的加入改变了白蛋白氨基酸残基的构象。这为深入研究金属络合物与生物大分子的作用机理提供了实验依据。

参考文献

- [1] 朱铨, 童沈阳. 蛋白质与酸性铬蓝 K 相互作用的分光光度研究[J]. 化学学报, 1996, 54(6): 620—624.
- [2] 林旭聪, 郭良洽, 张丽益等. 一种新的磺酸咪唑菁染料的荧光光谱分析及其应用研究[J]. 光谱实验室, 2007, 24(3): 471—476.
- [3] Tian J N, Liu J Q, He W Y *et al.* Probing the Binding of Scutellarin to Human Serum Albumin by Circular Dichroism Fluorescence Spectroscopy, FT IR, and Molecular Modeling Method[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(5): 1956—1961.
- [4] Papadopoulou A, Green R J, Frazier R A. Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53(1): 158—163.
- [5] 刘海洋, 王兴明, 戴亚堂等. 牛血清白蛋白与两种金属配合物的作用研究[J]. 无机化学学报, 2005, 21(9): 1422—1426.
- [6] 郭彦青, 李建晴, 卫艳丽等. 二磺荧光素与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 光谱实验室, 2006, 23(2): 304—308.

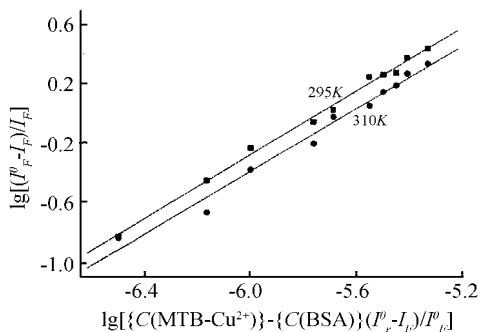


图6 $\lg[(I_F^0 - I_F)/I_F]$ 对 $\lg\{C(\text{MTB-Cu(II)}) - \{C(\text{BSA})\}(I_F^0 - I_F)/I_F^0\}$ 的关系图

- [7] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability [J]. *Biochemistry*, 1981, **20**(11): 3096—3102.
- [8] 原华平, 关洪亮, 潘祖亭. 氨苯砒与牛血清白蛋白相互作用的热力学研究[J]. 光谱实验室, 2005, **22**(6): 1192—1195.
- [9] 杨曼曼, 席小莉, 杨频. 变温下荧光猝灭和加强理论公式合理性的比较[J]. 化学学报, 2006, **64**(14): 1437—1445.
- [10] 谢孟峡, 徐晓云, 王英典等. 4', 5', 7-三羟基二氢黄酮与人血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J]. 化学学报, 2005, **63**(22): 2055—2062.
- [11] 毕淑云, 丁兰, 宋大千等. 几种抗生素与人血清白蛋白结合反应的研究[J]. 化学学报, 2005, **63**(23): 2169—2173.
- [12] BI S Y, SONG D Q, KAN Y H *et al.* Spectroscopic Characterization of Effective Components Anthraquinones in Chinese Medicinal Herbs Binds with Serum Albumin[J]. *Spectrochim. Acta Part A*, 2005, **62**(1—3): 203—212.
- [13] Ji Z S, Yuan H Z, Liu M L *et al.* $^1\text{H-NMR}$ Study of the Effect of Acetonitrile on the Interaction of Ibuprofen with Human Serum Albumin[J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **30**(1): 151—159.

Interaction between Methylthymol Blue-Cu(II) Complex and Albumin

DING Fei^{a,b} SONG Wei-Tang^a LIN Juan^b PAN Hong^a GAO Li^a

a(College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, P. R. China)

b(School of Chemical Engineering & Technology, China University of Mining & Technology, Xuzhou, Jiangsu 221008, P. R. China)

Abstract Under the imitated physiological condition, the interaction of Methylthymol blue-Cu(II) complex with Bovine serum albumin(BSA) was studied by fluorescence spectroscopy and ultra-violet spectrum. The combination reaction of MTB-Cu(II) and BSA is a static quenching process. According to Stern-Volmer equation and double-reciprocal equation, the formation constants of them (295K: $3.449 \times 10^5 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 310K: $2.792 \times 10^5 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$) and the thermochemical parameters ($\Delta H = -10.71 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\Delta S = 69.69 \text{J} \cdot \text{K}^{-1} / 69.71 \text{J} \cdot \text{K}^{-1}$; $\Delta G = -31.27 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} / -32.32 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) was obtained. The main binding force between MTB-Cu(II) and BSA is electrostatic force, binding MTB-Cu(II) to BSA is a spontaneous supermolecular interaction in which entropy increase and Gibbs free energy decrease. The binding distance ($r = 2.25 \text{nm}$) between MTB-Cu(II) complex and BSA was obtained by Foerster's theory, and the interaction interpret by energy transfer mechanism.

Key words Methylthymol Blue-Cu(II) Complex, Bovine Serum Albumin, Fluorescence Spectroscopy, Ultra-Violet Spectroscopy.

封四: “保质、高效 —— 《光谱实验室》主要特色”的附件 3

不当挂名院士

1922 年 2 月 23 日, 苏联社会主义社会科学院主席团给列宁发来了一个通知书, 说 1922 年 2 月 5 日列宁被选为研究院院士。列宁看了这个通知书, 并在下面写了复函, 还注明: “警在公文纸上, 交我签字。”

列宁复函写道: “非常感谢, 遗憾的是, 我因病根本无法履行社会主义研究院院士的哪怕最微小的职责。挂名的院士, 我不想当。因此, 请把从院士名单中勾掉或不要列入名单。”

列宁的复函, 言简意赅, 发人深思。列宁具有渊博的知识, 授予院士头衔是当之无愧的, 可是, 列宁不这样看。他考虑到自己无法履行院士的职责, 便毅然拒绝当挂名院士。

不当挂名院士, 只是一件小事, 但是, 列宁这种革命责任心和谦虚谨慎的科学态度, 实在令人敬佩。

(原载 1981 年 1 月 17 日《北京晚报》, 作者: 郭熙)

本刊主编点评: 我也曾请卢嘉锡先生任《光谱实验室》主编, 但卢先生谢绝了。他说, 请我任主编, 抬举我, 表示感谢。但是我年老多病, 体弱事多, 又不是学光谱专业的, 别人当面不说什么, 但背后是有议论的, 对刊物不利。