

# 头孢他啶与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用

梁彦秋 臧树良<sup>a</sup> 赵雪<sup>b</sup>

(沈阳化工学院环境系 沈阳市经济技术开发区 11 号街 110142)

<sup>a</sup>(辽宁石油化工大学化学学院 辽宁省抚顺市望花区丹东路西段 1 号 113001)

<sup>b</sup>(辽宁大学化学学院 沈阳市皇姑区崇山中路 66 号 110036)

**摘 要** 采用荧光、紫外及红外光谱法研究了头孢他啶与牛血清白蛋白(BSA)的结合反应。头孢他啶对 BSA 的色氨酸残基和酪氨酸残基均具有猝灭作用,其猝灭机理为静态猝灭,两者之间形成新的复合物是导致 BSA 荧光猝灭的主要原因。获取了复合物的结合常数(298K:  $1.27 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; 310K:  $1.33 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )。BSA IIa 结构域的 site I 位点是其唯一可能结合位点。同步荧光光谱表明头孢他啶造成 BSA 的酪氨酸残基的极性增强。红外光谱表明头孢他啶引起了 BSA 二级结构的改变,使其  $\alpha$ -螺旋含量降低。

**关键词** 牛血清白蛋白; 头孢他啶; 相互作用; 光谱法

中图分类号: O 657. 32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2009)06-1638-05

## 1 前言

蛋白质是生物体内具有重要生理功能的大分子,是药物发挥药效的重要载体和靶分子。头孢他啶(Ceftazidime),为第三代头孢菌素类抗生素。本品杀菌力强,抗菌谱广,对革兰阴性菌作用突出,对绿脓杆菌作用最强。因此,研究头孢他啶与牛血清白蛋白的相互作用,揭示药物药效的实质内涵具有重要意义。

目前,分子光谱法研究药物小分子与生物大分子的相互作用已有报道<sup>[1,2]</sup>,但头孢他啶与 BSA 相互作用的研究未见报道。本文采用光谱法研究了头孢他啶与 BSA 的相互作用,提供了一些重要的信息,为今后的临床用药提供了有益的参考。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国瓦里安公司); Cary 5000 紫外可见分光光度计(美国瓦里安公司); BSA (北京奥博星生物技术责任有限公司); HSA (人血清白蛋白); 头孢他啶(东北制药厂提供); 三者的配制和稀释均用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH= 7.40(内含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 维持离子强度)缓冲溶液。其余所用试剂均为分析纯,实验用水为亚沸水,经检测均无荧光杂质。

辽宁省教育厅(20060687)项目资助

联系人,电话: (024)89388160; 手机: (0)13840130292; E-mail: dalin0417@163.com

作者简介: 梁彦秋(1971—),女,辽宁省铁岭市人,博士,副教授,主要从事小分子和生物大分子的相互作用的研究工作。

收稿日期: 2009-04-04; 接受日期: 2009-04-20

## 2.2 实验方法

移取  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 溶液 3.0 mL 于石英比色皿中, 测定其发射光谱, 然后用微量进样器逐次加入头孢他啶溶液进行荧光滴定。利用温度控制器控温 298K、310K, 让两者充分反应后, 分别测定其发射光谱。同时记录 298K 的同步荧光光谱。

测定头孢他啶和 BSA 二者的物质质量比为 1:1 的紫外吸收光谱。两者浓度分别为  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

采用液池法测定, 扫描范围  $1800\text{—}1400 \text{ cm}^{-1}$ , 扫描次数 60 次, 分辨率  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 使用 ATR 的 ZeSe 晶片测定红外光谱。

## 3 结果与讨论

### 3.1 荧光光谱

在 BSA 的 581 个氨基酸残基中, 色氨酸残基和酪氨酸残基是主要的荧光发射团。图 1 为头孢他啶存在下 BSA 体系的荧光发射光谱。随着头孢他啶浓度的增大, BSA 在 346nm 处的荧光发射峰强度逐渐降低, 表现为荧光猝灭效应, 并且最大发射波长发生明显红移, 这均说明头孢他啶与 BSA 发生了结合反应。

### 3.2 荧光猝灭机理的探讨

药物分子对蛋白质荧光的猝灭可分为动态猝灭和(或)静态猝灭。有关猝灭机理及猝灭方式的判断参见文献[3]。采用 Stern-Volmer 方程(1)<sup>[3]</sup>求取猝灭常数, 结果见表 1。

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

式中:  $F$ ——有猝灭剂时蛋白的荧光强度;  $F_0$ ——无猝灭剂时 BSA 的荧光强度;  $[Q]$ ——猝灭剂浓度;  $K_{sv}$ ——动态猝灭常数, 单位是  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 它反映了生物大分子与荧光猝灭剂分子彼此扩散和相互碰撞到达动态平衡时的量效关系;  $K_q$ ——动态荧光猝灭速率常数, 单位是  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $\tau_0$ ——无猝灭剂时荧光分子的平均寿命, 生物大分子的荧光平均寿命约为  $10^{-8} \text{ s}$ <sup>[4]</sup>。

由表 1 可以看出荧光动态猝灭速率常数  $K_q$  远大于最大动态猝灭常数  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 说明头孢他啶的猝灭机理主要为静态猝灭。

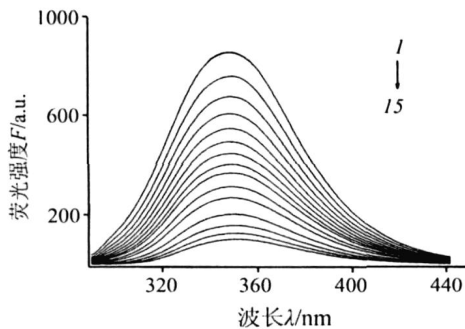


图 1 头孢他啶与 BSA 作用的荧光光谱图

( $T = 298\text{K}$ )

曲线 1—15 头孢他啶与 BSA ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 浓度比:  
0:1; 2:1; 4:1; 6:1; 8:1; 10:1; 12:1; 14:1; 16:1;  
20:1; 22:1; 24:1; 28:1; 32:1; 36:1。

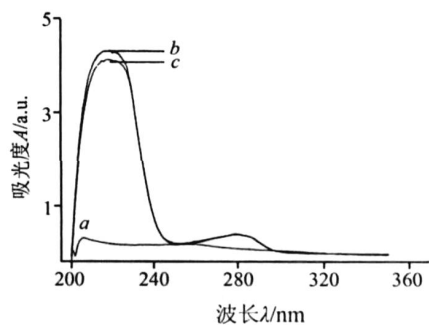


图 2 头孢他啶与 BSA 作用的吸收光谱图

( $T = 298\text{K}$ )

曲线 a—c 头孢他啶浓度为: 10, 0,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; BSA 浓度为: 0, 10,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3.3 紫外光谱

大多数蛋白质都在 220nm 附近有一个吸收峰, 该吸收主要由肽键上羰基  $\pi-\pi^*$  电子跃迁引起的。由图 2 可以看出, 加入头孢他啶后, BSA 在 220nm 的吸收峰表现为减色效应, BSA 紫外吸收光谱的变化进一步推断该结合反应的猝灭机理为静态猝灭。这进一步证明了头孢他啶与 BSA 形成了不发荧光的配合物从而导致 BSA 的荧光强度减弱。

### 3.4 结合常数的求取

当猝灭体分子和荧光物质分子之间形成新的复合物而发生静态猝灭时, 服从 Lineweaver-Burk 方程 (2)<sup>[4]</sup>:

$$(F_0 - F)^{-1} = (F_0)^{-1} + [K \cdot (F_0[Q])]^{-1} \quad (2)$$

式中:  $K$  —— 结合常数。采用  $(F_0 - F)^{-1}$  对  $[Q]^{-1}$  作图(图略), 由斜率可以计算出头孢他啶与 BSA 的结合常数  $K$ 。结合常数的数量级为  $10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 说明头孢他啶与 BSA 的结合很稳定。

表 1 不同温度下头孢他啶与 BSA 结合的相应常数及方程的相关系数

pH	血清蛋白	温度 (K)	动态猝灭常数	动态荧光猝灭速率常数	相关系数	结合常数 $K$	相关系数
			$K_{sv} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$R_1$	$(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$R_2$
7.40	BSA	298	$9.53 \times 10^3$	$9.53 \times 10^{11}$	0.9999	$1.27 \times 10^4$	0.9999
		310	$7.88 \times 10^3$	$7.88 \times 10^{11}$	0.9998	$1.33 \times 10^4$	0.9997

### 3.5 结合位点的确定

BSA 含有 2 个色氨酸残基, 分别为 IIA 结构域的 212 位和 IB 结构域的 134 位; 人血清白蛋白 (HSA) 只含有一个位于 IIA 结构域的 214 位的色氨酸残基<sup>[5]</sup>。通过比较头孢他啶分别对 HSA 和 BSA 的猝灭程度可以推断 BSA 的 2 个色氨酸残基是否同时与头孢他啶发生了作用。此外对于同一种蛋白, 当激发波长为 280nm 时可同时激发色氨酸和酪氨酸残基; 激发波长为 295nm 只激发色氨酸残基<sup>[6]</sup>。

由图 3 可以看出, 在激发波长 295nm 条件下, 头孢他啶对 BSA 和 HSA 的荧光猝灭程度基本相同, 说明 BSA 与头孢他啶作用时 IB 结构域的 134 位色氨酸残基没有参加反应, 只有位于 IIA 结构域的 212 位的色氨酸残基参与了作用。在 IIA 亚结构域的 Site I 位点中存在一个很大的疏水腔, 绝大部分小分子都与该亚结构域 IIA 结合, Site I 位点可能是头孢他啶与 BSA 的一个唯一的结合位点。图 4 表明在激发波长为 280nm 和 295nm 时头孢他啶对 BSA 的猝灭程度不同, 说明在头孢他啶与 BSA 的反应中色氨酸残基和酪氨酸残基均参加了作用。

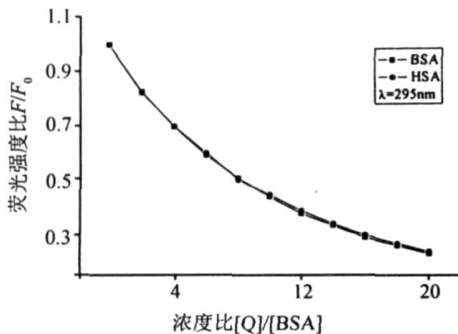


图 3  $\lambda_{ex}$  为 295nm 时, 头孢他啶与 HSA, BSA 作用的相对荧光曲线

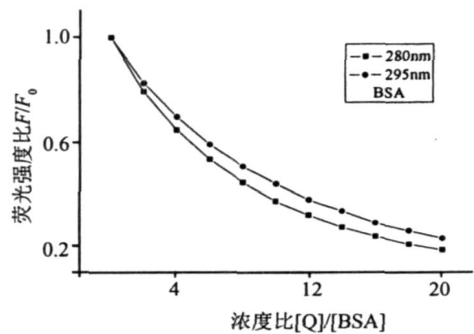


图 4  $\lambda_{ex}$  为 280nm 和 295nm 时, 头孢他啶与 BSA 作用的相对荧光曲线

### 3.6 牛血清白蛋白构象的变化

同步荧光光谱法被用于蛋白质构象的分析主要是基于  $\Delta\lambda$  的变化来加以考察的。当  $\Delta\lambda = 15\text{nm}$  时, 只显示酪氨酸残基的特征荧光; 当  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$  时, 只显示色氨酸残基的特征荧光<sup>[7]</sup>。而色氨酸、酪氨酸残基的最大发射波长变化情况与其所处的微环境紧密相关, 最大峰的红移或者蓝移说明氨基酸周围微环境的极性增强或者疏水性增强<sup>[8]</sup>。

图 5 为头孢他啶与 BSA 作用时的同步荧光光谱。由图可知, 随着头孢他啶的加入, 酪氨酸和色氨酸残基均产生猝灭。此外, BSA 中的酪氨酸的最大发射波长发生明显红移, 而色氨酸发射峰波长基本不变。这表明头孢他啶与 BSA 发生作用时改变了酪氨酸残基的微环境, 使得 BSA 腔内疏水环境的极性增强, 疏水性减弱, 从而导致 BSA 的构象发生了变化。

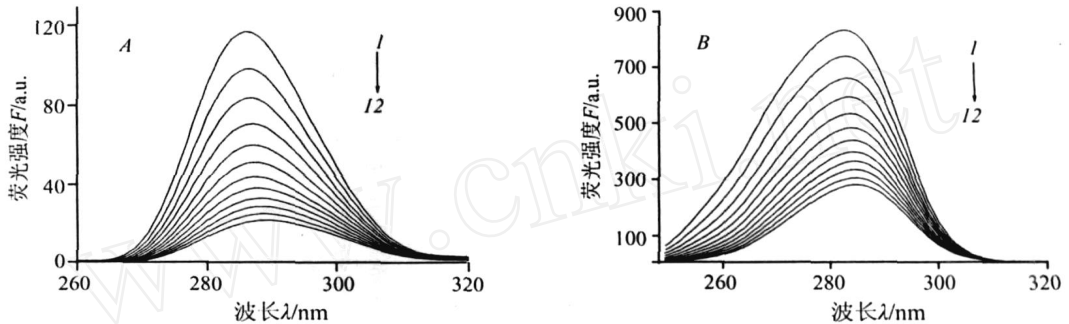


图 5 头孢他啶对 BSA 同步荧光光谱的影响

A ——  $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ ; B ——  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 。

曲线 1—12 头孢他啶与 BSA ( $1.0 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 浓度比:

0 1; 2 1; 4 1; 6 1; 8 1; 10 1; 12 1; 14 1; 16 1; 20 1; 22 1; 24 1。

### 3.7 红外光谱对 BSA 二级结构的影响

从红外光谱谱图看, 加入头孢他啶后, 蛋白质酰胺 I 带和酰胺 II 带的峰位都没有明显的移动, 但他们的相对强度发生了变化。为了能够反映红外谱图中这种微小的差别, 用与头孢他啶作用后的 BSA 的红外谱图差减作用之前的 BSA 的红外谱图, 结果见图 6。从图 6 可以看出, 当头孢他啶和 BSA 的浓度比为 1:1 时, BSA 的红外差谱中  $1653\text{cm}^{-1}$  和  $1547\text{cm}^{-1}$  就有负峰出现, 表明 BSA 与头孢他啶发生了作用。从差谱图中可以看出随着头孢他啶浓度的增加, 差减谱中  $1653\text{cm}^{-1}$  和  $1547\text{cm}^{-1}$  两个负峰强度继续增加, 这充分地说明加入头孢他啶后引起了 BSA 二级结构的变化,

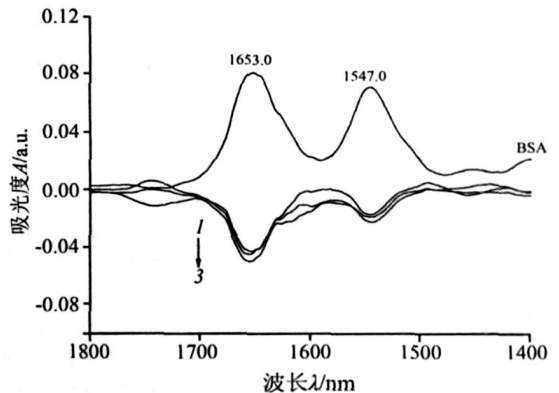


图 6 BSA 及 BSA 与头孢他啶作用后的红外差谱

曲线 1—3 头孢他啶与 BSA ( $5.0 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 浓度比:

1 1; 5 1; 15 1。

$1653\text{cm}^{-1}$  附近的负峰显示了酰胺 I 带的  $\alpha$ -螺旋含量的降低<sup>[9]</sup>。

## 参考文献

[1] 梁彦秋, 邓斌, 孙鹏等. 杂多酸盐  $\text{K}_7[\text{PT}_{12}\text{W}_{10}\text{O}_{40}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 无机化学学报, 2007, 23(4):

688—692

[2] 杨慧, 王志群, 王宇春等. 荧光光谱法研究奥美拉唑和埃索美拉唑与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱实验室, 2008, 25(3):

284—289

- [3] Hu Y J, Liu Y, Zhao R M *et al* Interaction of Colchicine with Human Serum Albumin Investigated by Spectroscopic Methods[J]. *Int J. Biol. Macromol.*, 2005, **37**: 122—126
- [4] 杨频, 高飞 生物无机化学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [5] 常希俊, 杨芳, 张莉等 牛血红蛋白与镉(III) 钛(IV) 的相互作用[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2004, **40**(2): 62—66
- [6] Sulowska A, Bojko B, Rownicka J *et al* Paracetamol and Cytarabine Binding Competition in High Affinity Binding Sites of Transporting Protein[J]. *J. Mol. Struct.*, 2006, **792**: 249—256
- [7] Hu Y J, Liu Y, Zhao R M *et al* Spectroscopic Studies on the Interaction Between Methylene Blue and Bovine Serum Albumin[J]. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2006, **179**: 324—329
- [8] 常希俊, 黄艳, 贺群 铀(VI) 离子与人血清白蛋白的作用研究[J]. 化学学报, 2005, **63**(3): 223—228
- [9] 谢孟峡, 刘媛 红外光谱酰胺 III 带用于蛋白质二级结构的测定研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, **24**(2): 226—231

## Interaction of Cefazidime with Bovine Serum Albumin

LIANG Yan-Qiu ZANG Shu-Liang<sup>a</sup> ZHAO Xue<sup>b</sup>

(Department of Environmental Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang 110142, P. R. China)

<sup>a</sup>(Department of Chemistry, Liaoning Shihua University, Fushun, Liaoning 113001, P. R. China)

<sup>b</sup>(Department of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036, P. R. China)

**Abstract** The binding characteristics of cefazidime with BSA was studied by fluorescence spectrometry, UV absorption spectra and FT-IR spectra. The fluorescence of tryptophyl and tyrosyl residues are both weakened in the presence of cefazidime. The mechanism is static quenching. The formation of new complex between cefazidime and BSA predominately quenched the intrinsic fluorescence of BSA. The binding constants were obtained as  $1.27 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  and  $1.33 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  at 298K and 310K respectively. The only binding site probably is site I in IIA subdomain. Synchronous fluorescence spectra indicated the increase of the polarity around tyrosine residues by addition to cefazidime. Infrared spectral result revealed that the binding of cefazidime induced second structure changes in BSA, resulting in the decrease of  $\alpha$ -helical.

**Key words** Bovine Serum Albumin; Cefazidime; Interaction; Spectrometry

### 关于赠送作者样刊和发放稿酬的通知

各有关作者:

从 2007 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, 若遗失或被邮局退回, 不再补赠。作者另有需要, 请在发表之日起 2 个月之内汇款购买(第 1 期 70 元/本; 其余 40 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

欲购买者请直接通过电子邮件(发到 gp\_sys@263.net)与本编辑部联系。