

双酚 A 与人血清白蛋白作用特征的热力学研究^①

李少旦^② 黎明强 蒙进怀 覃华菁 罗正华 卢小玲 覃芸
宁玉华 李德洁 李华茜

(广西柳州市疾病预防控制中心 广西柳州市 545001)

摘要 利用荧光光谱和吸收光谱法研究了双酚 A 与人血清白蛋白结合反应的特征, 实验结果表明, 双酚 A 对人血清白蛋白有较强的荧光猝灭作用, 根据荧光猝灭数据和非辐射能量转移机理, 由 Stern-Volmer 和 Lineweaver-Burk 方程处理实验数据, 得到了结合反应的结合常数、结合位置和结合过程的基本热力学参数。

关键词 双酚 A, 人血清白蛋白, 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)02-0161-04

1 引言

通过对人血清白蛋白(Human Serum Albumin HSA)溶液的荧光特征峰及其在不同条件下的荧光强度变化和荧光峰位移情况的测量, 可以获得外源性物质与生物大分子相互作用的有关数据。利用荧光光谱和吸收光谱研究了酚类环境雌激素双酚 A (BPA) 与 HSA 的相互作用, 研究了其在不同温度条件下平衡结合常数(K)、结合位点数(n)及热力学参数, 这对于探讨 BPA 等酚类环境雌激素在人体内的致病机制、获取 HSA 分子信息和研究建立新的灵敏度高、选择性好的检测方法具有较大的意义。

2 实验部分

2.1 主要仪器与试剂

Hitachi F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司), Lambda25 紫外可见分光光度计(美国 PE 公司), pH5-C pH 计(上海雷磁仪器厂)。

人血清白蛋白(生化试剂 美国 Sigma 公司) 储备溶液(1×10^{-4} mol/L), 在冰箱中保存, 使用时用水稀释至所需工作溶液。

双酚 A 标准储备溶液(1×10^{-4} mol/L); pH2.4 Tris-HCl 缓冲溶液; 除特别说明外, 均为分析纯试剂, 实验用水为二次蒸馏水。

① 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅自筹经费立项课题, 课题编号: Z2006307

② 联系人, 电话: (0772) 2837761; E-mail: lsdy@126.com

作者简介: 李少旦(1975—), 男, 湖南省邵阳市洞口县人, 硕士研究生, 主管技师, 研究方向: 有毒有害物质检测方法及分子机理的光谱研究。

2.2 实验方法

荧光光谱测定: 在 10mL 的比色管中, 依次加入 2.0mL HSA 溶液, 不同量的双酚 A 标准工作溶液, 最后以 pH2.4 Tris-HCl 缓冲溶液定容至刻度, 室温下放置 20min 后, 以 $\lambda_{ex} = 290\text{nm}$, $\lambda_{em} = 351\text{nm}$, 于 200—600nm 范围内扫描 HSA 的荧光光谱及在 BPA 对 HSA 的荧光猝灭光谱。

吸收光谱测定: 在 10mL 的比色试管中, 依次加入 2.0mL HSA 溶液、1.5mL 双酚 A 标准工作溶液, 最后以 pH2.4 Tris-HCl 缓冲溶液定容至刻度, 室温下放置 20min 后, 以蒸馏水为参比扫描吸收光谱(扫描范围: 200—800nm)。

3 结果与讨论

3.1 不同温度下的 Stern-Volmer、Lineweaver-Burk 方程及结合位点数

按照实验方法, 分别在 20℃和 35℃时, 测定加入不同量的 BPA 对 HSA 荧光强度的变化。由实验数据分别得到 HSA 的 Stern-Volmer 曲线和 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 对实验数据线性拟合得到线性回归方程、相关系数见表 1。

表 1 线性回归方程和相关系数

曲线	T/K	线性回归方程	相关系数
Stern-Volmer	293	$F_0/F = 0.7638 + 2.531 \times 10^6 C_{\text{BPA}}$	0.9872
	308	$F_0/F = 0.8142 + 3.027 \times 10^6 C_{\text{BPA}}$	0.9635
Lineweaver-Burk	293	$(F_0 - F)^{-1} = 0.07581 + 2.836 \times 10^{-8} C_{\text{BPA}}^{-1}$	0.9984
	308	$(F_0 - F)^{-1} = 0.09143 + 3.172 \times 10^{-8} C_{\text{BPA}}^{-1}$	0.9990

对于静态猝灭, 荧光分子与猝灭剂的相互结合的位点数(n)可由公式 $\lg[(I_0 - I)/I] = \lg K + n \lg C_{\text{BPA}}$ 即位点结合模型^[1]求得, 分别为 1.81(293K), 1.86(308K)。可以看出, BPA 与 HSA 结合位点数约为 2, 它们之间的结合常数比较大, 说明它们之间有较强的结合力, 可以在体内被蛋白质运输和储存。

3.2 平衡结合常数与热力学参数^[2,3]

有机小分子与生物大分子蛋白质的作用力包括氢键、范德华力、静电引力和疏水作用力等, 有机小分子不同, 与蛋白质作用力类型也不同。为了探讨 BPA 与 HSA 相互作用的作用力, 引入热力学参数。当温度变化不大时, 反应焓变值(ΔH)可以看作是一个常数, 根据热力学公式:

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H}{R} \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2} \quad (1)$$

$$\Delta G = -TR \ln K \quad (2)$$

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

及不同温度下的平衡常数 K , 分别求得 ΔH 、 ΔS (熵变)和 ΔG (自由能变)值见表 2。

表 2 结合反应的结合常数和热力学参数

温度(K)	$K (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
293	2.673×10^6	3.76	135.87	-36.05
308	2.882×10^6		135.88	-38.09

结果表明: 该反应的 $\Delta G < 0$, 说明该反应在此条件能自发进行; 而 $\Delta H > 0$, 故为吸热反应; $\Delta S > 0$, 则为熵增反应, 可见反应温度升高对反应有利。由此推测: BPA 与 HSA 的相互作用机制的主要是因 BPA 受 HSA 分子中疏水基团吸引, 进入 HSA 分子三维空间结构内部, 由此而破坏 HSA 分子的立体构型(由有序变为无序, 即与熵增相符), 可能导致荧光基团色氨酸等残基的微环境改变, 共

轭体系消失, 所以发射荧光强度下降。可见 BPA 与 HSA 相互之间的结合作用力主要为“疏水作用力”, 生成的产物可能是一种无荧光特性的复合物。

3.3 能量转移理论及结合位置^[4, 5]

荧光静态猝灭的基础是荧光分子(或反应产物)之间发生了非辐射能量转移, 从而导致荧光猝灭。根据 Foster 提出的偶极-偶极非辐射能量转移理论, 当溶液中供能体与受能体足够接近, 最大距离不超过 7nm, 且供能体的荧光发射光谱与受能体的吸收光谱有足够重叠时, 它们将会发生非辐射能量转移现象。

实验中 HSA 的荧光光谱与 BPA 溶液的紫外-可见吸收光谱之间有着较大程度的重叠(见图 1)。

根据 Foster 偶极-偶极非辐射能量转移机理, 能量转移效率为 E 、授体-受体间距离 r 、临界能量转移距离 R_0 及重叠积分 J 的相互关系为:

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

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (5)$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad (6)$$

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (7)$$

式中 K 是偶极空间取向因子, 取平均值 $2/3$, N 为介质的折射指数, 取平均值 1.366, Φ 为色氨酸残基量子效率, 取 0.118, J 是 HSA 的荧光发射光谱与 BPA 吸收光谱间的光谱重叠积分, $F(\lambda)$ 为授体在波长 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 则为受体在波长 λ 处的摩尔吸光系数。通过上述关系式分别求得 $E = 0.284$, $r = 2.31\text{nm}$ 。

参考文献

- [1] Mauricio S B, Guilherme L J. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes[J]. *phys. Chem.*, 1998, **102**: 4678—4687.
- [2] 李少旦, 黎明强, 蒙进怀. 氯酚类物质测定新方法及其与人血清白蛋白的相互作用[J]. *分析测试学报*, 2006, **25**(5): 21—24.
- [3] 卢继新, 张贵珠, 赵鹏等. 阿霉素与血清白蛋白的作用及共存离子对反应影响的研究[J]. *化学学报*, 1997, **55**(9): 915—920.
- [4] 颜承农, 上官云凤, 林立敏等. 氯霉素与牛血清蛋白质结合反应热力学特征研究[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2006, **40**(1): 66—69.
- [5] HU Y J, LIU Y, ZHANG L X *et al.* Studies of Interaction between Colchicines and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Quenching Method[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2005, **750**: 174—178.

Thermodynamic Studies on the Binding Feature between BPA and Human Serum Albumin

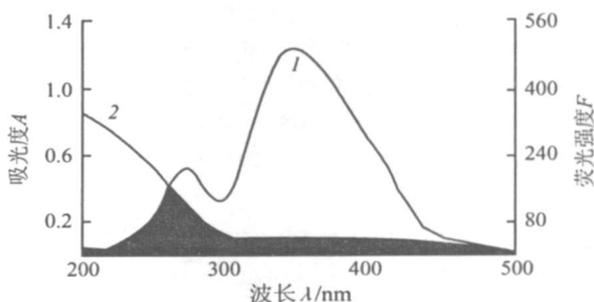


图 1 HSA 的荧光光谱(1)和 BPA 的吸收光谱(2)

LU Xiao-Ling YUN Qin NING Yu-Hua LI De-Jie LI Hua-Xi
(Guangxi Luzhou Center for Disease Prevention and Control, Luzhou, Guangxi 545001, P. R. China)

Abstract The characteristics of the binding reaction of biphenol A (BPA) with Human Serum Albumin(HAS) was investigated by fluorescence and absorption spectra. The BPA exhibits a strong quenching effect on the fluorescence of HSA, through a nonradiative energy transfer. The data of fluorescence quenching were analyzed according to Stern-Volmer and Lineweaver-Burk equation, the binding constant of the reaction, the position of binding and the basic thermodynamic parameters of the binding process were obtained, respectively.

Key words BPA, Human Serum Albumin, Thermodynamic Parameters.

致本期及以往各期每篇论文的联系 人 拟赠《光电光谱分析》一书的通知

各有关同志:

《光电光谱分析》是我们编辑出版的一套丛书,共分4册(净重1.7kg),主要内容如下文所述。如果你认为对你有参考价值的话,可以赠送你一套(邮资自付,普通印刷品8元,挂号另加3元,请用邮票支付),有意者可来信告知收件人和详细地址,同时将邮票放在信中挂号寄来。

《光谱实验室》编辑部

2007年3月25日

电话:(010)62452937, 电邮:gpsys@263.net; gpsys81@citiz.net; gpsysh@public.sti.ac.cn,

联系地址:北京市81信箱66分箱《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林,邮编:100095

《光电光谱分析》主要内容如下:

本书(增刊)由周开亿主编,韦雅文、谢荣厚等为技术顾问。由《光谱实验室》编辑部编辑,已出版。1套4册,16开,共1236页,185万字。

第1册:光电光谱分析原理,30万字。论述了光电光谱分析的特点和应用范围、激发光源、分光系统、接收系统、计算机、定量分析方法、数据处理等。主要执笔者为南开大学翁永和教授。

第2册:光电光谱仪,70万字。介绍了国产的和进口的(美、英、日、德、瑞士等国)光电光谱仪的仪器结构,特点,功能,软件,日常操作等。由各个公司提供材料,主要执笔者有长城铝业公司金海泉高级工程师、贵阳钢厂李锦光高级工程师、华山机械厂郝庚民高级工程师、天津师范大学高宝岩副教授、本溪钢铁公司张宝森、周玉臣高级工程师、大连耐酸泵厂王春德高级工程师、钢铁研究总院谢荣厚教授等。

第3册:光电光谱分析方法和应用,65万字。其中有钢铁分析、有色金属分析、地质物料分析、化工环保试样分析、同位素分析等。主要执笔者由钢铁研究总院韦雅文高级工程师、本溪钢铁公司张宝森、周玉臣高级工程师、沈阳有色金属加工厂梁愚铃高级工程师、河南岩石矿物测试中心陈方伦高级工程师、北京铀矿地质研究所谭世源高级工程师、复旦大学杨之昌教授等。

第4册:附录.光电光谱分析简明手册,20万字。介绍了从事光电光谱分析常用的物理-化学常数,常用分析线波长,谱线和背景干扰状况,试样化学处理方法,计量单位的换算等。由沈阳有色金属加工厂梁愚铃高级工程师编写,中国科学院物理研究所赵玉珍研究员等审校。

本书(增刊)比较全面地总结了三十年来我国光电光谱分析工作的经验,比较集中地反映了各种高新技术和电子计算机在光谱分析中的应用,是理论与实际密切结合并兼有手册性的著作。

《光电光谱分析》1套4册,价值110元。