

紫外和圆二色光谱研究三环唑与牛血清白蛋白的相互作用

丁成荣¹,高晓茹¹,许莉²,张国富¹,周瑛¹

(1.浙江工业大学 化学工程与材料学院,杭州 310032; 2.浙江大学 化学系,杭州 310027)

摘要:通过紫外(UV)和圆二色(CD)光谱,研究三环唑与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用及其浓度变化对牛血清白蛋白(BSA)的影响。研究表明:三环唑对牛血清白蛋白的影响是多方面的。紫外吸收光谱表明三环唑与牛血清白蛋白(BSA)借助分子间力形成超分子基态复合物,此外由于它们之间的疏水作用,导致BSA紫外吸收强度随三环唑浓度增大逐渐增强;CD光谱表明三环唑与BSA间的疏水作用使BSA的肽链发生收缩、重排。三环唑导致BSA的构象发生变化。

关键词:紫外光谱;圆二色谱;牛血清白蛋白;三环唑

中图分类号:TQ460.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1006-0413(2010)01-0029-02

The Interaction between Tricyclazole and Bovine Serum Albumin by UV and Circular Dichroism

DING Cheng-rong¹, GAO Xiao-ru¹, XU Li², ZHANG Guo-fu¹, ZHOU Ying¹

(1.College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China;
2.Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: The interaction between tricyclazole and bovine serum albumin (BSA) and the effect of different tricyclazole concentration to bovine serum albumin (BSA) had been studied by ultraviolet (UV) and circular dichroism (CD) spectroscopy. The results showed that the effect of tricyclazole to bovine serum albumin was multifaceted. The absorption spectra of UV showed that tricyclazole and bovine serum albumin (BSA) form the ground-state supramolecular complex with intermolecular forces. At the same time, hydrophobic interactions lead to a gradual increase intensity of UV absorption. The CD spectra showed that the peptide chain of BSA occurs contraction and rearrangement because of hydrophobic interactions and intramolecular hydrogen bonds. The conformation of BSA had been changed.

Key words: ultraviolet spectra; circular dichroism; bovine serum albumin; tricyclazole

蛋白质是极为重要的生命物质,是生命活动的执行者^[1]。药物小分子与蛋白质相互作用的研究是介于化学与生命科学之间的边缘性课题,也是生命科学、化学和医学界共同关注的课题。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)是血浆中含量最丰富的载体蛋白,它能与许多内源、外源性化合物相结合^[2]。当药物分子进入人体后,通过血浆的贮存和运输,到达受体部位,进而发生药理作用。农药是一类对人畜具有毒性作用的特殊药物,对其与蛋白质分子作用特征的研究方兴未艾^[3]。三环唑(tricyclazole)又名克瘟灵、克瘟唑,是一种较强内吸性的保护性杀菌剂,主要用于稻瘟病的防治,具有一定的毒性,其残留会对环境和人畜造成一定的危害^[4]。本文利用紫外(UV)和圆二色(CD)光谱法对三环唑与牛血清白蛋白的相互作用进行研究,结果表明三环唑与BSA相互作用与其浓度变化有关。该研究为从分子水平上了解农药分子在动物体内转运、代谢过程中及中毒机制,提供理论依据^[5]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

紫外-可见分光光谱仪(Cary-100型,美国Varian公司),圆二色(CD)光谱仪(Jasco-815型,日本分光公司),PHS-3C型酸度计(上海雷磁仪器厂),AY-120电子分析天平(日本岛津公司)。

三环唑原药(95%,杭州南郊化学有限公司)用无水乙醇溶解后,用磷酸缓冲液配制浓度为0.002 mol/L的原液,实验时稀释至所需浓度。牛血清白蛋白(BSA)(上海华美生物工程公司)以pH=7.26, 10 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲溶液配制浓度为2×10⁻⁵ mol/L和5×10⁻⁵ mol/L的储备液,冰箱4℃保存。其他试剂均为分析纯试剂,实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

紫外光谱:在5 mL的容量瓶中分别加入5×10⁻⁵ mol/L的BSA溶液1.0 mL和不同量的三环唑溶液,用NaH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲溶液定容至刻度,放置3 h后,用1.0 cm的石英

收稿日期:2009-10-12,修返日期:2009-11-28

基金项目:浙江工业大学应用化学省重中之重学科开放基金资助(56310101622)

作者简介:丁成荣(1966—),男,教授,主要从事农药合成及农药对环境的影响分析等方面的研究。

通讯作者:许莉(1967—),女,江西南昌人,副教授,主要从事农药分析及残留等方面的研究。Tel:0571-88320147, E-mail:gaoxiaoru123@163.com。

比色皿,以磷酸缓冲液为参比,于波长190~320 nm进行扫描,测定其紫外光谱。

CD光谱:在10 mL的容量瓶中分别加入 2×10^{-5} mol/L的BSA溶液1.0 mL和不同量的三环唑溶液,用磷酸缓冲液定容至刻度,放置3 h后,用1.0 cm的石英比色皿,以磷酸缓冲液作为参比,于190~320 nm进行扫描,测定其CD光谱。

2 结果与讨论

2.1 三环唑与BSA相互作用的紫外光谱

紫外测定中,BSA的浓度为 1×10^{-5} mol/L,磷酸缓冲液的浓度为10 mmol/L, pH=7.22,摩尔比 $n(\text{BSA}) : n(\text{三环唑}) = 1 : 10$,由测定结果可知,BSA的磷酸缓冲液有2个吸收峰(见图1a),分别在235、275 nm处,其中275 nm处的吸收峰是BSA分子中的2个色氨酸和19个酪氨酸的芳香环的 $\pi-\pi^*$ 和 $n-\pi^*$ 跃迁引起的,而235 nm处的吸收峰则主要是由肽键上C=O的 $n-\pi^*$ 跃迁引起的,与BSA的 α -螺旋含量有关^[6]。三环唑的乙醇溶液在200~360 nm无吸收。10%的乙醇溶液使BSA有一定程度的增色效应(见图1b),这是由于少量乙醇的疏水作用使BSA的结构有一定的改变,即肽链收缩使吸收峰微弱增强。加入三环唑后,表现出更加明显的增色效应(见图1c)。235 nm处的吸收峰强度增强且峰位明显向高波长移动,275 nm的吸收也表现为增色效应,峰位略微向高波长移动,说明三环唑与BSA借助分子间力形成超分子基态复合物,导致BSA多肽链重排,分子内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳香环疏水基团裸露,同时由于疏水基团之间疏水作用, $\pi-\pi^*$ 和 $n-\pi^*$ 跃迁能量增大,因而使峰位向高波数微小位移,表明三环唑导致BSA发生了构象改变。

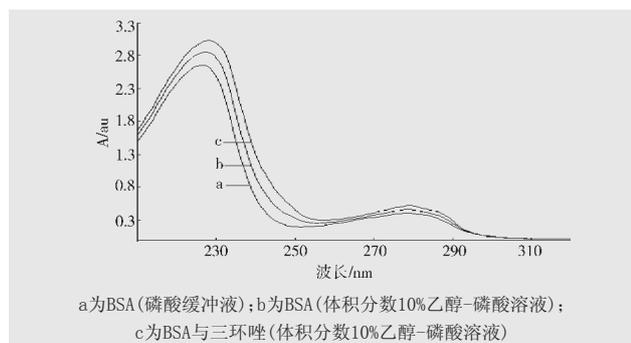


图1 三环唑与BSA相互作用的紫外光谱

三环唑浓度对BSA紫外光谱的影响见图2,BSA所有吸收峰的峰位和强度均有改变,即在235、275 nm处,随着三环唑和BSA摩尔比的增加吸收峰表现为很强的增色效应,且峰位均产生红移,说明三环唑与BSA相互作用导致复合物的生成。三环唑浓度越大,对BSA的构象影响越大,色氨酸和酪氨酸芳香环残基的裸露越多。在三环唑和BSA的摩尔比达到20:1以上时,BSA在289 nm处出现

一个新的峰位,表明BSA的多肽链发生重排,形成新的结构,BSA的构象已发生变化。

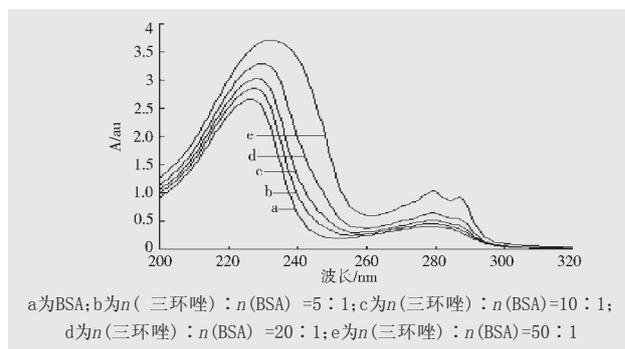


图2 三环唑浓度对BSA的影响

2.2 三环唑与BSA相互作用的CD光谱

BSA的浓度为 2×10^{-6} mol/L,磷酸缓冲液的浓度为10 mmol/L, pH=7.22,改变三环唑的浓度,使摩尔比 $n(\text{BSA}) : n(\text{三环唑})$ 分别为1:0、1:5、1:20、1:50,放置一定时间,测定其CD光谱(见图3)。BSA溶液显示出了BSA中 α -螺旋结构的3个特征峰,192 nm有1个正峰,208、222 nm处有2个负峰,吸收峰的强度可以反映蛋白质 α -螺旋的含量^[7]。当逐渐增加三环唑的浓度时,圆二色谱图中BSA在222 nm的峰强度均增加,说明疏水作用导致BSA的结构收缩, α -螺旋结构含量增加,证明三环唑与BSA相互作用导致蛋白质多肽链的重排,蛋白质构象发生变化。

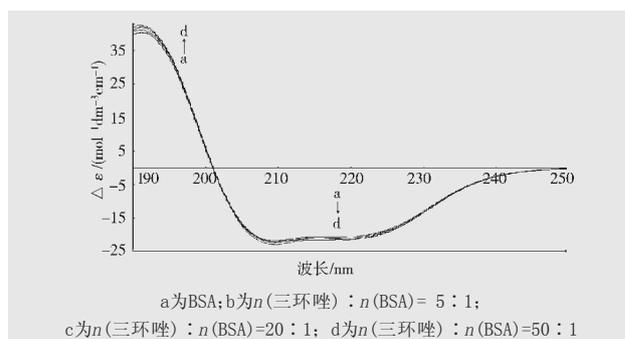


图3 不同浓度的三环唑与BSA相互作用的CD光谱

用杨氏法计算得到BSA二级结构中 α -螺旋等的含量(见表1)。

表1 三环唑的浓度对BSA二级结构的影响

$n(\text{BSA}) : n(\text{三环唑})$	α -螺旋/%	β -螺旋/%	转角/%	无规则卷曲/%	总量/%
BSA缓冲溶液	51.8	9.8	5.0	33.4	100
BSA(体积分数10%乙醇-磷酸溶液)	52.9	6.8	6.3	33.9	100
1:5	54.1	5.7	6.6	33.6	100
1:20	54.6	4.4	6.5	34.6	100
1:50	55.4	2.9	6.8	34.9	100

(下转第38页)

按标样溶液、样品溶液、样品溶液、标样溶液顺序进行测定。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

经过全波长扫描,发现烯肟菌胺在275 nm处有最大吸收,最终选择275 nm作为检测波长。

2.2 方法的线性

用500 mg/L标准液配制成质量浓度分别为10.0、5.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1、0.05 mg/L标准液,分别进样分析,得到烯肟菌胺峰面积。以标准液质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。得烯肟菌胺标准曲线为 $y=19.764x+0.305$,相关系数为0.9999。表明烯肟菌胺在质量浓度0.05~10.0 mg/L范围内,峰面积与质量浓度间线性关系良好。

2.3 方法的准确性

采用标准添加法,在已知含量的样品中加入一定量的烯肟菌胺标准溶液,按照上述色谱条件测定高、低2个质量浓度的回收率,测得烯肟菌胺平均回收率为96.2%,说明该方法准确性良好(见表1)。

表1 方法准确性测定结果

添加质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	回收率/%					平均回收率/ %
	1	2	3	4	5	
2.0	98.3	100.2	94.6	92.3	95.4	96.2
0.2	92.5	96.4	93.8	102.4	95.7	

2.4 方法的精密度

选取具有代表性的样品按照上述方法重复测定5次,结

(上接第30页)

BSA(体积分数10%乙醇)的 α 螺旋的含量较BSA磷酸缓冲溶液的 α 螺旋增加,这是因为醇类物质可以作为 α 螺旋的诱导剂。但是加入三环唑后的BSA中 α 螺旋的含量均比BSA(体积分数10%乙醇)高,且随着三环唑浓度增大而依次增加,分别是54.1%、54.6%、55.4%。 β 螺旋的含量随三环唑浓度的增加而依次减少,这是由于三环唑与BSA发生作用后,使BSA与溶剂间的氢键作用力减弱,多肽链内部的氢键相对加强。 β 螺旋转化为 α 螺旋,疏水作用导致BSA结构收缩,多肽链进行重排,构象发生变化。与紫外光谱的结论吻合。

3 结论

紫外和圆二色光谱研究三环唑与BSA相互作用的结果表明:三环唑与BSA之间形成了超分子基态复合物,三环唑与BSA之间的作用主要是疏水作用,此外还受到部分氢键的影响。紫外光谱中随着三环唑浓度的增加,BSA吸收峰的强度表现为明显的增色效应且峰位产生红移现象,证明三环唑与BSA之间形成了复合物。圆二色光谱图

果显示该方法的标准偏差为0.0285,变异系数为0.2953%,说明该方法精密度较高(见表2)。

表2 方法精密度测定结果

编号	峰面积	标准偏差	变异系数/%
1	9.651	0.0285	0.2953
2	9.667		
3	9.667		
4	9.663		
5	9.600		

2.5 方法的检出限与定量限

该方法的色谱条件下,仪器对烯肟菌胺原药的检出限为0.02 mg/L,定量限为0.05 mg/L。

2.6 专属性

该方法的色谱条件下,峰形良好,其他物质对烯肟菌胺原药测定无干扰。

3 结论

本方法具有准确性与精密度较高、线性关系良好、操作简单、快速、分离效果好的优点,是定量分析烯肟菌胺原药较为理想的方法。

参考文献:

- [1] 佚名. 新农药介绍: 烯肟菌胺[J]. 农药科学与管理, 2005, 26(5): 45.
- [2] 司乃国, 刘君丽, 杨瑞秀, 等. 新杀菌剂烯肟菌胺(SYP-1620)对苹果病害的防治效果[J]. 农药, 2008, 47(8): 561-562.
- [3] 司乃国, 刘君丽, 陈亮, 等. 创制杀菌剂烯肟菌胺生物活性及应用(I)——小麦白粉病[J]. 农药, 2008, 47(10): 712-714.

责任编辑: 李新

中,随着三环唑浓度的增大,BSA的负峰吸收强度逐渐增强,即 α 螺旋的含量增加,也证明了三环唑与BSA作用后导致蛋白质构象发生变化。

参考文献:

- [1] 王志珍, 邹承鲁. 后基因组一蛋白质组研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(6): 533-539.
- [2] 金瑞祥, 张贵珠, 冯喜增, 等. 氟喹啉酮类药物与牛血清白蛋白作用的研究[J]. 分析科学学报, 1997, 13(2): 108-112.
- [3] 颜承农, 张华新, 刘义, 等. 百草枯与牛血清白蛋白结合作用的荧光光谱[J]. 化学学报, 2005, 63(18): 1727-1732.
- [4] 程运斌, 刘育清. 异稻·三环唑20%可湿性粉剂的气相色谱分析[J]. 农药分析, 2008, 30(9): 18-20.
- [5] 张朝红, 臧树良, 耿兵, 等. 紫外和圆二色光谱法研究丁基锡化合物与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析科学学报, 2005, 21(2): 179-181.
- [6] CHENG Zheng-jun, ZHANG Yun-tao. Fluorometric Investigation on the Interaction of Oleanolic Acid with Bovine Serum Albumin[J]. Science Direct, 2008, 879: 81-87.
- [7] FASMAN G D. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules[M]. New York: Plenum Press, 1996: 738-740.

责任编辑: 李新