诺氟沙星与卵清蛋白相互作用的研究

卢秀敏,陈得军,王公轲,杨海艳,卢

河南师范大学化学与环境科学学院,河南 新乡 453007

摘 要 应用荧光光谱法和紫外光谱法研究了诺氟沙星(NRF)与卵清蛋白(OVA)的相互作用, 计算了诺氟 沙星与卵清蛋白之间的结合常数和结合位点数。实验发现卵清蛋白的最大发射峰位于 338 nm, 当向该溶液 中滴加诺氟沙星时,该发射峰强度明显减弱,且向长波长方向稍有移动。实验表明:随着温度升高,卵清蛋 白的猝灭曲线斜率降低,证实了诺氟沙星与卵清蛋白的相互作用为单一的静态猝灭过程,同时随着溶液 p H 值的增大, 诺氟沙星对卵清蛋白的猝灭程度逐渐降低。根据热力学参数确定了诺氟沙星与卵清蛋白之间主 要以静电作用力相结合。最后利用紫外光谱法证明了诺氟沙星对卵清蛋白构象产生了影响。

关键词 诺氟沙星;卵清蛋白;荧光猝灭;热力学参数;紫外吸收光谱

中图分类号: O433.1 文献标识码: A **DOI**: 10. 3964/j. issn. 1000-0593 (2009) 01-0236-04

引言

蛋白质是生物体中必不可少的生命物质。关于蛋白质的 研究一直是科研工作者感兴趣的内容[1-4]。蛋白质与内源性 化合物及许多药物分子之间可以发生相互作用而结合为复合 物。目前,光谱法在这方面的研究主要针对血清白蛋白,对 于其他蛋白质的研究很少。从不同角度考察不同蛋白质与药 物之间的相互作用对于更全面地了解药物的转运和代谢过程 以及阐明蛋白质与药物小分子相互作用的化学本质都具有非 常重要的意义。卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)是单体磷糖蛋 白,由于卵清蛋白具有较好的起泡性、亲水性和乳化性能, 加热后又易形成凝胶,而被广泛应用于婴儿食品、肉加工 业、面包和甜点制造业中[5]。诺氟沙星(norfloxacin, NRF)是 第三代喹诺酮类合成抗菌药,对革兰阴性菌、金黄色葡萄球 菌有很强的杀菌作用[6]。本文应用荧光光谱法研究了不同酸 度,不同温度条件下诺氟沙星与卵清蛋白的相互作用,利用 诺氟沙星对蛋白质荧光的猝灭求出了诺氟沙星与卵清蛋白的 结合常数和结合位点数,并计算了它们之间相互作用的热力 学参数。同时还利用紫外吸收光谱法考察了诺氟沙星对 OVA 构象的影响。这对阐明蛋白质与药物之间的作用方式 有一定的指导意义。

实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津公司), Lambda-17 型紫外-可见分光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司), PHS-2C (A) 型精密酸度计(上海大普仪器有限公司)。

卵清蛋白(OVA, 联星生物公司)1.0 x10-4 mol·L-1储 备液,诺氟沙星(河南天方药业股份有限公司提供):20 x 10⁻³ mol·L⁻¹水溶液,缓冲溶液 pH 值分别为 5.8,7.4 的 磷酸盐缓冲液, pH值为 8.4的 Tris HCl缓冲液(均含 0.01 mol ·L · 1的 NaCl)。

所有试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

将一定量的 OVA 与 NRF 溶液依次加入到 10 mL 容量 瓶中,以相应的缓冲溶液稀释至刻度,混匀,于水浴中恒温。 测定荧光发射光谱的激发波长为 280 nm, 扫描范围为 300~ 500 nm_o

将一定量的 OVA 与 NRF 溶液依次加入到 10 mL 容量 瓶中,以相应的缓冲溶液稀释至刻度,混匀。以相应的 NRF 溶液为参比,测定紫外吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭

蛋白质中因含有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Try)、苯丙氨酸 (Phe) 等氨基酸残基而产生较强的内源荧光, NRF 在与 OVA 相互作用过程中能猝灭 OVA 的荧光强度。图 1 为 30 , p H 7. 4 时 NRF 猝灭 OVA 的荧光发射光谱。激发波长

收稿日期: 2007-09-26, 修订日期: 2007-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(20673034)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20060476001)资助

作者简介: 卢秀敏, 女, 1981 年生, 河南师范大学化学与环境科学学院硕士研究生 e-mail: wanggongke @126.com *通讯联系人

为 280 nm 时,蛋白质分子中色氨酸残基和酪氨酸残基的最大荧光强度的波长分别位于约 340 和 300 nm 左右。由图可以看出,随着溶液中 NRF 浓度的增大,OVA 在 338 nm 处的荧光发射峰出现了明显的猝灭现象,说明蛋白质与 NRF 结合使色氨酸周围的微环境发生了改变,OVA 分子的空间构象也发生了变化。从图中还可看出,随着 NRF 浓度的增加,在蛋白质荧光猝灭的同时,荧光发射峰的峰位也出现了明显的红移现象,说明色氨酸的亲水性增加^[7]。

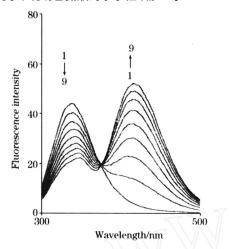


Fig. 1 Effect of NRF on Fluorescence spectra of OVA $cov_A = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol } \cdot L^{-1}; c_{NRF}/(10^{-5} \text{mol } \cdot L^{-1}), 1 \sim 9:0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0; 1.2; 1.4; 1.6$

对于 NRF, 激发波长为 280 nm 时, 在约 415 nm 处有荧光发射峰, 当不断增加 NRF浓度时, 发射峰强度不断增加。

一般情况下,荧光猝灭过程通常可以分为动态猝灭和静态猝灭。荧光猝灭数据通常用 Sterm Volmer 方程^[8]来进行分析

$$F_0/F = 1 + K_{q 0}[Q] = 1 + K_{SV}[Q]$$
 (1)

式中: F_0 和 F 分别是不存在和存在猝灭剂时的荧光强度; K_q 为双分子猝灭过程速率常数, $_0$ 为无猝灭剂时荧光体的 荧光寿命,对于生物大分子, $_0=10^{-8}$ s^[9,101],[Q]是猝灭剂 的浓度; K_{SV} 称为 Stern-Volmer 猝灭常数。根据 Stern-Volmer 方程,以 F_0/F 对[Q]作图,由直线斜率可得到 NRF 对 OVA 的猝灭速率常数 K_q 为 6. 31 ×10¹² L ·mol⁻¹·s⁻¹。由于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散控制的碰撞猝灭速率常数为 2.0 ×10¹⁰ L ·mol⁻¹·s⁻¹[1111],NRF 对 OVA 的猝灭速率常数 K_q 远大于这一数据,表明此体系的猝灭过程不是由于分子扩散和碰撞而引起的动态猝灭,而是分子之间形成了化合物而引起的静态猝灭[121]。

2.2 温度的影响

分别测定了 30 和 45 p H 为 7. 4 条件下 NRF 对 OVA 的荧光猝灭光谱。根据 Stern Volmer 方程,作两个温度下的 $F_0/F\sim [Q]$ 图 (见图 2)。判断是动态猝灭还是静态猝灭,还可根据猝灭常数 K_{SV} 随温度的变化关系加以判断。对于动态猝灭作用,温度升高有利于荧光体和荧光猝灭剂之间的有效碰撞, K_{SV} 随温度的升高而增大;若是静态猝灭,温度升高,复合物的稳定性降低,静态猝灭常数减小 $[^{13}]$ 。从图 2 可以看

出,随着温度升高,直线斜率减小,表明猝灭为静态猝灭机理。

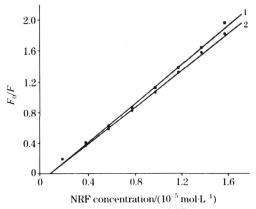


Fig 2 Stern Volmer plot of NRF vs OVA
at different temperature

1:303 K; 2:318 K

2.3 pH值的影响

分别测定了 p H 为 5. 8、7. 4 和 8. 4 条件下 30 的 NRF 对 OVA 的荧光猝灭光谱 (图略)。结果显示,随着 p H 值的增大,NRF 发射峰的荧光强度逐渐减小,且峰位也发生了改变。原因可能是因为 NRF分子中含有羰基、羧基和氨基,而氮原子和氧原子在不同酸碱溶液中其激发态分子可产生与它在基态时明显不同的结构及电子分布,质子迁移反应相当迅速,可以在分子仍处于激发态的情况下发生,结果可能就引起了发射峰强和峰位的变化 [14]。根据 Stern-Volmer 方程,作不同 p H 值下的 $F_0/F \sim [Q]$ 图 (见图 3)。从图中可以看出,随着溶液中 p H 值的增大,直线斜率减小,表明 p H 值增大,NRF 对 OVA 的猝灭程度逐渐减小。

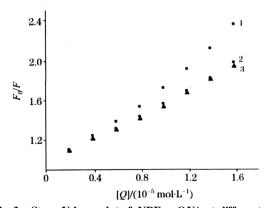


Fig. 3 Stern-Volmer plot of NRF vs OVA at different pH 1: pH 5. 8; 2: pH 7. 4; 3: pH 8. 4

2.4 结合常数和结合位点数

对于静态猝灭过程, 荧光强度与猝灭剂的关系符合下述 方程^[15]

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K + n\log[Q] \tag{2}$$

式中, F_0 和 F 分别是不存在和存在猝灭剂时的荧光强度,K 为蛋白质与猝灭剂的结合常数,n 为结合位点数,[Q]是猝灭

剂的浓度。

根据此方程,把所得到的数据以 $\log[(F_0 - F)/F]$ 对 $\log[Q]$ 作图(图 4),由直线的截距和斜率可求得药物与蛋白质分子的结合常数 K 和结合位点数 n。由图得出,30 与 45下 NRF与 OVA 的结合常数分别为 2. 74 ×10⁵ 和 1. 77 ×10⁵ L ·mol⁻¹,结合位点数分别为 1. 14 和 1. 10。

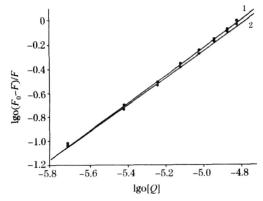


Fig 4 Plot of log(F₀ - F) / F vs log[Q] 1: 303 K: 2: 318 K

2.5 作用力类型的确定

药物与蛋白质之间作用的热力学参数,H,G,S,可以根据以下热力学公式算出 $^{[16,17]}$

$$\ln\frac{\underline{K}_2}{K_1} = \frac{\underline{H}}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \tag{3}$$

$$G = -RT \ln K \tag{4}$$

$$S = (H - G)/T \tag{5}$$

根据两个温度下得到的结合常数经计算得到,30 = 45下的 H, G, S分别为 -22.61 kJ \cdot mol $^{-1}$, -31.54 kJ \cdot mol $^{-1}$, 29.47 J \cdot K $^{-1}$ 和 -22.61 kJ \cdot mol $^{-1}$, -31.95 kJ \cdot mol $^{-1}$, 29.37 J \cdot mol $^{-1}$ \cdot K $^{-1}$ 。Ross $^{[18]}$ 等根据大量的实验结果,总结出了判断生物大分子与小分子结合力性质和生物大分子自身结合力性质的热力学规律,即疏水作用力有可能使体系的 H 和 S 增大,氢键或者范德华力有可能使体系的 H 和 S 减小,静电作用力使 H 0, S>0。对于所研究的反应, H 为负值, S 为正值,因此可以认为诺氟沙星与OVA 之间主要以静电作用力相结合。

2.6 紫外吸收光谱的测定

对于研究有机小分子与蛋白质的相互作用,紫外吸收光谱法是一种简单有效的方法。蛋白质之所以能产生紫外吸收光谱,其主要原因是色氨酸和酪氨酸等氨基酸残基对光的吸收引起的,此外还有肽键对光的强烈吸收。在 250~280 nm之间的吸收峰是由酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸三种芳香族氨基酸引起的。为了证明加入 NRF后 OVA 的结构变化,实验测定了紫外吸收光谱(图 5),由图可以看出,加入 NRF后,OVA 在约 260 nm 左右的吸收峰的增强,并且峰位发生蓝移,表明加入 NRF后,引起了芳香族氨基酸残基的微环境发生了变化,从而导致了蛋白质分子的构象发生了改变。

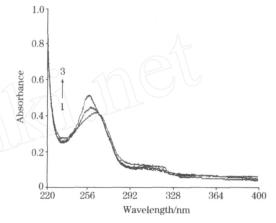


Fig 5 UV/ Vis spectra of OVA in the presence of NRF $c_{\text{OVA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol } \cdot \text{L}^{-1};$ $c_{\text{NRF}}/(10^{-5} \text{ mol } \cdot \text{L}^{-1}), 1 \sim 3:0:4:6$

3 结论

实验结果表明,诺氟沙星对卵清蛋白的荧光产生猝灭,并且表现为静态猝灭机理。随着溶液中 p H 值的增大,诺氟沙星对卵清蛋白的荧光猝灭程度逐渐减小。通过对诺氟沙星与卵清蛋白作用的热力学参数的计算,得出二者主要以静电作用力相结合。由紫外吸收光谱得出,诺氟沙星对卵清蛋白的构象产生了影响。

参 考 文 献

- [1] XIE Wen-jun, FENG Yu-ping, CAO Sheng-li, et al (谢文俊, 冯玉萍, 曹胜利, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(10): 1876.
- [2] YAN Cheng nong, SHANGGUAN Yurrfeng, PAN Zurting, et al (颜承农, 上官云风, 潘祖亭, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry (分析化学), 2004, 32(2): 317.
- [3] ZHAO Changchun, ZHENG Wei-fa, LI Meng qiu(赵长春, 郑维发, 李梦秋). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 111.
- [4] YI Ping gui, SHANG Zhi-cai, YU Qing sen, et al (易平贵, 商志才, 俞庆森, 等). Acta Chimica Physical Sinica (化学物理学报), 2003, 16(5): 420.
- [5] Kelley D , McClements D J . Food Hydrocolloids , 2003 , 17(1):73.
- [6] TAN Feng, LANG Hui-yun, JIAO Geng-sheng(谭 峰, 郎惠云, 焦更生). Analytical Laboratory(分析试验室), 2001, 20(4): 58.
- [7] Naseem R H, Khan S K, Had A N. Biochim. Biophys. Acta, 2003, 1649(2): 164.

- [8] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1999.
- [9] ZHANG Hai-rong, GUO Si-yuan, LI Lin, et al (张海容, 郭祀远, 李 琳, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 829.
- [10] Lakowica J R, Weber G. Biochemistry, 1973, 12(21): 4161.
- [11] Ware W R. J. Phys. Chem., 1962, 66(3): 455.
- [12] ZHANG Yong, YAN Ximliang, LEI Ya-chun, et al(张 勇, 燕新梁, 雷亚春, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(8): 1274.
- [13] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓). Methods of Fluorescence Analysis, 2nd Ed(荧光分析法·第2版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 122.
- [14] BIAN Jiang yu, XU Li-ying, SUN Jing feng (边江鱼, 徐莉英, 孙景峰). Journal of Analytical Science (分析科学学报), 2006, 22(1):
- [15] XIE Meng xia, XU Xiao yun, WANG Ying dian, et al (谢孟峡, 徐晓云, 王英典, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2005, 63(22): 2055
- [16] ZHU Keng, TONG Shen-yang(朱 铿, 童沈阳). Chemical Research in Chinese Universities(高等学校化学学报), 1996, 17(4): 539.
- [17] Klotz I M, Jean M. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(3): 847.
- [18] Ross P D, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096.

Studies on the Reaction of Norfloxacin with Ovalbumin

LU Xiu-min, CHEN De-jun, WANG Gong-ke, YANG Hairyan, LU Yan*
College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract The interaction between norfloxacin (NRF) and ovalbumin (OVA) was studied by fluorescence and absorption spectroscopy. The binding constants and the binding sites were measured by fluorescence quenching method. It was found that the emission peak of OVA was positioned at 338 nm. When the norfloxacin was added into OVA solution gradually, the intensity of 338 nm emission peak of OVA decreased obviously and moved towards long wavelength. The experiment demonstrated that the higher the temperature, the lower the slopes of quenching curves of OVA in the presence of different amounts of NRF. It was confirmed that the combination of NRF with OVA is a single static quenching process. With the increase in the pH of the solution, the quenching efficiency decreased in the binding. From thermodynamic parameters, it can be judged that the binding power between OVA and NRF is electrostatic effect and H-bond formation. The UV-Vis absorption spectra of OVA in the presence of NRF show that the conformation of OVA changed.

Keywords Norfloxacin; Ovalbumin; Fluorescence quenching; Thermodynamic parameters; UV-vis spectroscopy

(Received Sep. 26, 2007; accepted Dec. 29, 2007)

* Corresponding author