

达旦黄与牛血清白蛋白结合的热力学研究

毕欣颖, 迟燕华*

西南科技大学化学系, 四川 绵阳 621010

摘要 采用荧光光谱法和紫外-可见吸收光谱法研究了达旦黄(TY)与牛血清白蛋白(BSA)结合反应的特征。实验发现: TY对BSA有较强的荧光猝灭作用, 根据荧光猝灭数据, 由Stern-Volmer方程和Line weaver-Burk双倒数方程得到了反应的结合常数和热力学参数, 并由此推出了结合反应的主要作用力类型。在此基础上依据Förster非辐射能量转移机理, 探讨了TY与BSA相互结合时, 给体-受体间的距离和能量转移效率。从而证实了该结合作用为单一静态猝灭过程, 并阐明了其猝灭机制是通过能量转移产生的。

主题词 达旦黄; 牛血清白蛋白; 荧光光谱法; 结合反应; 热力学参数

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)11-2097-04

引言

基因是遗传信息的携带者, 蛋白质是基因的表达产物和生命活动的执行者。因此, 研究蛋白质与金属离子、药物及有机小分子结合反应的热力学及机理一直是当今生命科学、化学和临床医学研究的重要组成部分^[1]。白蛋白是主要的血清蛋白, 可与许多内源、外源性化合物结合, 是生命活动重要的存放和运送蛋白^[2]。TY是含有2个磺酸基的苯并噻唑偶氮阴离子染料(见图1), 也是一种常用的血液离子诊断用药。本实验采用荧光光谱法和紫外吸收法研究了BSA与TY的结合反应, 利用其对BSA荧光的猝灭作用, 得到了TY与BSA结合反应的结合常数、结合热力学函数及参数、结合位点数及结合位置, 并根据热力学参数确定了TY与BSA之间的主要作用力类型。又依据能量转移机制计算了TY与BSA第212位色氨酸之间的距离及能量转移效率。该项研究为探讨在外源物质TY作用下BSA构型的变化, 及阐明TY在BSA中的储存方式和作用机理提供了可资参考的实验数据与理论根据, 而且对临床诊断用药的选择也具有一定的实用价值。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司); Cary-100

紫外-可见分光光度计(澳大利亚 Varian 公司); 酸度计 868 型(美国, Thermo orion); 恒温制冷加热浴(丹麦, Heto-CBN 8-30); 移液器(德国, Eppendorf); 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司)。

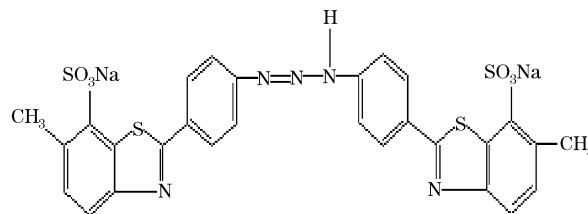


Fig. 1 Structure of titan yellow

牛血清白蛋白(生化试剂 上海丽珠东风生物技术有限公司) 0.45 mg · mL⁻¹, 置冰箱 0~4 °C 保存; 达旦黄(分析纯 上海化学试剂厂) 5.0 mg · L⁻¹, 室温避光保存; 其余试剂均为分析纯; britton-robinson(B-R)缓冲溶液; 实验用水为二次去离子水。

1.2 实验方法

准确移取 1.0 mL BSA 溶液于 10.0 mL 容量瓶中, 再加入适量 TY 溶液, pH 由 B-R 缓冲溶液控制(pH 6.0), 以二次去离子水定容后摇匀。然后置于 1 cm 荧光比色皿中, 固定荧光激发波长 280 nm, 入射和出射狭缝均为 5.0 nm, 扫描荧光光谱并测量荧光强度。

收稿日期: 2005-11-02, 修订日期: 2006-02-16

基金项目: 国家教育部科学技术研究重点项目(02126), 国家电分析化学重点实验室基金项目(2005007)和四川省科学技术重点攻关项目(03GG009-024)资助

作者简介: 毕欣颖, 女, 1979 年生, 西南科技大学化学系硕士研究生 * 通讯联系人

2 结果与讨论

2.1 TY 对 BSA 的荧光猝灭光谱

蛋白质中由于色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基的存在使其具有较强的内源荧光。当固定 BSA 的量, 随着 TY 浓度的增加, BSA 的内源荧光强度有规律的降低, 但它的峰位及峰型基本不变, 这说明 TY (TY 的结构见图 1) 对 BSA 的荧光有猝灭现象。如图 2 所示。

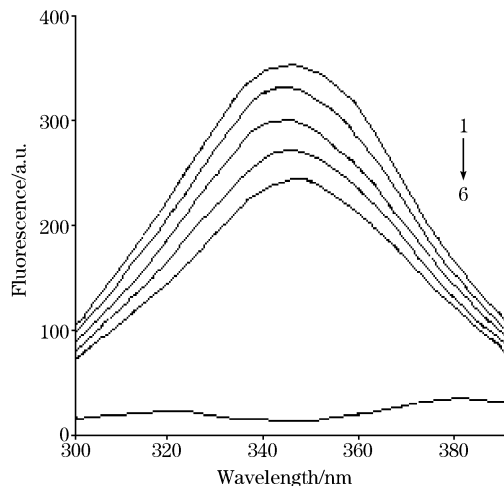


Fig. 2 Fluorescence quenching spectra of BSA as TY were added ($\lambda_{ex} \setminus \lambda_{em} = 280/340 \text{ nm}$)

$c_{TY} (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1: 0; 2: 0.134; 3: 0.402; 4: 0.670; 5: 0.804;
 c_{BSA} : $0.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 6: c_{TY} : $0.72 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (blank)

2.2 荧光猝灭作用的类型

荧光分子与其他分子相互作用引起荧光强度降低的现象称为荧光猝灭, 可分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是猝灭剂和荧光分子之间因彼此扩散和碰撞导致荧光物质荧光减弱的现象。其碰撞猝灭过程遵循 Stern-Volmer 方程^[3]

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 c_Q = 1 + K_{SV} c_Q$$

式中, F_0 为未加入猝灭剂时荧光物质的荧光强度; F 为猝灭剂浓度等于 c_Q 时荧光物质的荧光强度; k_q 为双分子猝灭过程的速率常数; τ_0 为无猝灭剂存在下荧光分子的平均寿命; K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数。由于生物大分子荧光寿命约为 10^{-8} s , 故可根据猝灭常数 K_{SV} 求得猝灭速率常数 k_q , 且各类猝灭剂对生物分子的最大扩散碰撞猝灭速率常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。而静态猝灭是猝灭剂和荧光物质相互作用生成了一定构型化合物导致荧光物质荧光强度减弱

的现象。静态猝灭符合 Line weaver-Burk 双倒数方程^[4]

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} F_0^{-1} c_Q^{-1}$$

式中, K_{LB} 为 Line weaver-Burk 猝灭常数。

按实验方法分别测定 27 和 40 °C 时体系的荧光猝灭光谱, 以 $F_0/F \sim c_Q$ 绘制 TY 猝灭 BSA 的 Stern-Volmer 曲线 (见图 3) 和以 $(F_0 - F)^{-1} \sim c_Q^{-1}$ 作 Line weaver-Burk 双倒数曲线 (见图 4)。对图中的曲线进行线性拟合得到线性回归方程、相关系数 (见表 1)。当温度变化不大时, 结合反应的焓变可看成一常数, 根据热力学公式

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

$$\Delta G^\theta = -RT \ln K^\theta$$

$$\ln(K_2/K_1) = (\Delta H^\theta/R) \cdot (1/T_1 - 1/T_2)$$

可求得反应的 ΔH^θ , ΔS^θ 和 ΔG^θ 等热力学函数的变化 (见表 2)。

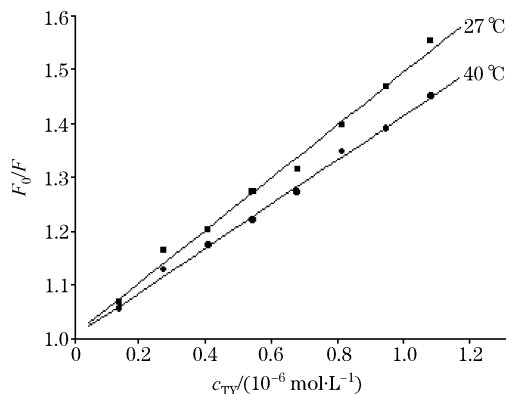


Fig. 3 The Stern-Volmer curves on fluorescence quenching of TY with BSA

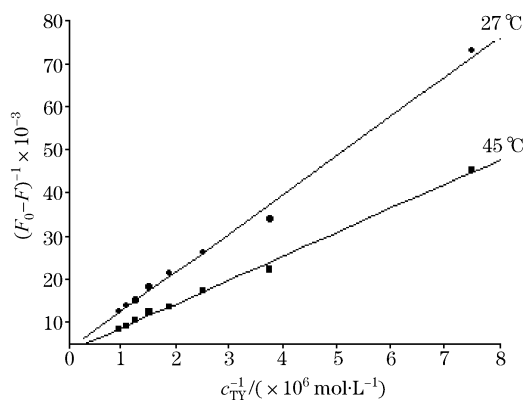


Fig. 4 The line weaver-Burk curves on fluorescence quenching of TY with BSA

Table 1 Regression equations and correlation coefficient

Examples	Regression equations	r
Fig. 2(27 °C)	$F_0/F = 1.009 + 4.899 \times 10^5 c_{TY}$	0.995 7
Fig. 2(40 °C)	$F_0/F = 1.007 + 4.113 \times 10^5 c_{TY}$	0.998 2
Fig. 3(27 °C)	$(F_0 - F)^{-1} \times 10^3 = 3.208 + 5.571 \times 10^{-6} c_{TY}^{-1}$	0.997 9
Fig. 3(40 °C)	$(F_0 - F)^{-1} \times 10^3 = 3.675 + 9.081 \times 10^{-6} c_{TY}^{-1}$	0.996 7

Table 2 The binding constants and the thermodynamic parameters

$t/^\circ\text{C}$	$K_{\text{SV}}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_{\text{q}}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{\text{LB}}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$\Delta H/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
27 °C	4.899×10^5	4.899×10^{13}	5.759×10^5		58.46	-33.08
40 °C	4.113×10^5	4.113×10^{13}	4.047×10^5	-15.54	58.46	-34.13

由表 1 和表 2 可以看出, 随温度升高, BSA 的猝灭曲线斜率降低, 且其动态猝灭速率常数又远远大于猝灭剂对生物分子的最大扩散碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 初步证明此过程为静态猝灭。由图 5 也可看出, BSA 反应前后紫外-可见吸收光谱的变化, 这说明反应生成了新的复合物。因而可进一步推断 TY-BBA 复合物的形成引起了静态猝灭。

2.3 结合位点数及结合常数的求算

对于静态猝灭过程, 蛋白质与小分子的结合位点数 n 可由荧光体和猝灭剂间的结合常数表达式导出^[5]

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_0 + n \lg [Q]$$

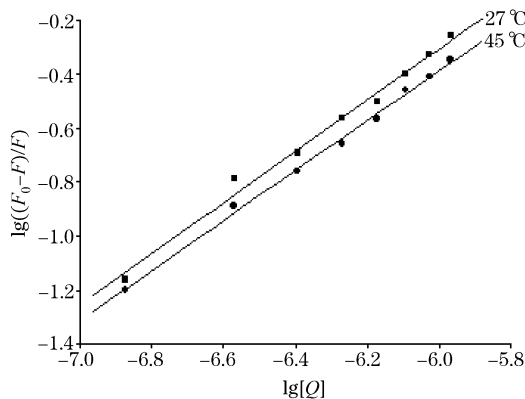
按上式进行数据处理, 以对 $\lg \frac{F_0 - F}{F} [Q]$ 作图(见图 5), 通过线性拟合可得到该直线的斜率和截距, 进而求得蛋白质与小分子的结合位点数 n 和结合常数 K_0 (见表 3)。可以看出, TY 与 BSA 的结合位点数 $n=1$, 结合常数也较大, 随着温度的升高 TY 与 BSA 结合常数 K_0 减小, 这说明 TY 与 BSA 之间的作用力较弱。

Table 3 The binding situation and binding constant of titan yellow with BSA

$t/^\circ\text{C}$	Regression equations	n	K_0	r
27 °C	$\lg((F_0 - F)/F) = 5.393 + 0.9495 \lg[Q]$	0.9495	2.470×10^5	0.9946
40 °C	$\lg((F_0 - F)/F) = 5.178 + 0.9272 \lg[Q]$	0.9272	1.506×10^5	0.9983

2.4 TY 与 BSA 结合作用力类型的确定

根据分子结构可知, 蛋白质与有机小分子之间的作用力应当属于分子间的弱相互作用, 包括氢键、范德华力、静电引力和疏水力^[6]。通过计算反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小, 可以判断有机小分子与蛋白质之间的主要作用力。由表 2 可知, $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 。根据总结的判别规则^[7], $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, 两者之间的作用力应为静电力。但是, 在 pH 6.0 时, BSA 和 TY 都带负电荷, 两者之间存在静电斥力。Ross 等认为, 在很多情况下, 即使 $\Delta H < 0$, 蛋白质和一些小分子之间的主要作用力仍为疏水力。因此, BSA 和 TY 两者之间主要以疏水作用力结合。

Fig. 5 Plots of $\lg((F_0 - F)/F)$ versus $\lg[Q]$

$$[Q] = c_{\text{TY}}; c_{\text{BSA}} = 0.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

2.5 TY 在 BSA 上的结合位置

根据 Förster 的偶极-偶极无辐射能量转移理论^[8], 能量转移效率 E 与给体和受体的距离 r 及临界能量转移距离 R_0 ,

由下列关系式可得出

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

$$R_0 = 8.8 \times 10^{-25} (K^2 Y n^{-4} J) \quad (2)$$

其中 K^2 为偶极空间取向因子, 可取受体和给体各向随机分布的平均值 $2/3$; n 为介质的折射指数, 一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336; Y 为给体的荧光量子产率, 取 BSA 中色氨酸的量子产率 0.118; J 为给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的重叠积分

$$J = \int F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \int F(\lambda) \Delta\lambda \quad (3)$$

其中, $F(\lambda)$ 为荧光给体在波长 λ 时的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 时的摩尔吸光系数, 能量转移效率可通过实验由下式得到

$$E = 1 - F/F_0 \quad (4)$$

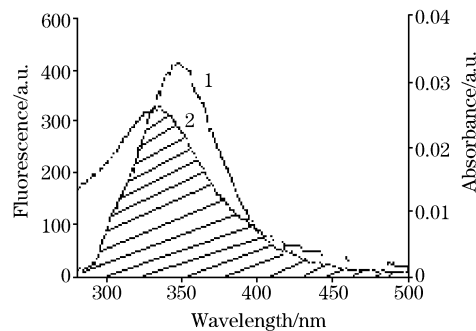


Fig. 6 The fluorescence emission spectrum of BSA(1) and the absorption spectrum of TY(2)

由图 6 可见, TY 的紫外吸收光谱与 BSA 的荧光光谱有较大程度的重叠, 将重叠部分分割成极小的矩形面积求和。求得 TY 与 BSA 的重叠积分 $J = 2.57 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot$

mol^{-1} , 临界距离 $R_0 = 2.87 \text{ nm}$, 利用 TY 与 BSA 摩尔比 1:1 时复合物的荧光强度, 按式(1)~(4)求得能量转移效率 $E = 0.19$, $R_0 = 2.87 \text{ nm}$, TY 与 BSA 上氨基酸残基间的距离 $r = 3.65 \text{ nm}$, 小于 7 nm , 符合能量转移理论, 说明 TY 与 BSA 的结合是通过能量转移机制而使蛋白质荧光熄灭。

2.6 TY 对 BSA 猝灭机理的讨论

BSA 的空间结构由 3 个结构域组成, 且每个结构域由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 几乎所有疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒的内部, 构成疏水腔, 134 和

212 位色氨酸残基分别位于结构域 I 和结构域 II 中[8]。由 BSA 与 TY 结合作用力类型可推测, TY 与 BSA 的结合部位处于这种疏水环境中。由于 BSA 的荧光主要是由 212 位色氨酸残基发出的, 可以认为 TY 对 BSA 的荧光猝灭作用主要源于与结构域 II 中 212 位色氨酸残基的结合。这种结合一方面阻碍了 BSA 分子内芳香氨基酸残基间的能量转移^[9]; 另一方面, BSA 疏水腔内的色氨酸残基与 TY 发生了非辐射能量转移, 从而使 BSA 的内源荧光猝灭。

参 考 文 献

- [1] YI Ping-gui, LIU Jun-feng, SHANG Zhi-cai, et al(易平贵, 刘俊峰, 商志才, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 826.
- [2] 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.
- [3] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤志, 郑朱梓, 等). Methods of Fluorescence Analysis(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 502.
- [4] YAN Cheng-nong, SHANGGUAN Yun-feng, TONG Jin-qiang, et al(颜承农, 上官云凤, 童金强, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 543.
- [5] XU Tong-kuan, SHEN Xing-hai, GAO Hong-cheng(徐同宽, 沈兴海, 高宏成). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(6): 857.
- [6] YU Ying, ZHOU Zhen-tao(俞英, 周震涛). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(4): 628.
- [7] Ross P D, Sabramanian S. Biochemistry, 1981, 20: 3096.
- [8] YANG Pin(杨频). Introduction to Biological Inorganic Chemistry(生物无机化学导论). Xi'an: Xi'an Jiaotong University Press(西安: 西安交通大学出版社), 1991.
- [9] MA Chun-qi, LI Ke-an, ZHAO Feng-lin, et al(马春琪, 李克安, 赵凤林, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1997, 57: 389.

Studies on the Thermodynamics and Mechanism of Combination Reaction of Titan Yellow with Bovine Serum Albumin

BI Xin-ying, CHI Yan-hua*

Department of Chemistry, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

Abstract The characteristics of the binding reaction of titan yellow(TY) with bovine serum albumin(BSA) were studied by fluorescence and ultraviolet-visible absorption spectra. It was shown that TY has a powerful ability to quench the fluorescence intensity of BSA. The fluorescence quenching data were analyzed according to Stern-Volmer equation and Line weaver-Burk equation and the binding constant, and thermodynamic parameters were obtained. According to the thermodynamic parameters the main sorts of binding force were determined. The binding distance and energy transfer efficiency between the donor (BSA) and the acceptor (TY) were obtained by Förster's non-radiative energy transfer mechanism. It is confirmed that the combination reaction of TY with BSA is a single static quenching process, and their interaction may be interpreted with energy transfer mechanism.

Keywords Titan yellow(TY); Bovine serum albumin(BSA); Fluorescence spectrometry; Combination reaction; Thermodynamic parameters

(Received Nov. 2, 2005; accepted Feb. 16, 2006)

* Corresponding author