

荧光法研究牛血清白蛋白与三羟基苯基荧光酮-钼(VI)配合物探针的作用机理

黄建华¹, 马洪敏², 孙舒婷², 陈欣², 董海霞³, 魏琴²

1. 河南科技学院化工系, 河南 新乡 453003
2. 济南大学化学化工学院, 山东 济南 250022
3. 山东基恩医药研究有限公司, 山东 济南 250100

摘要 用荧光光谱法研究了三羟基苯基荧光酮(TH-PF)-钼(VI)配合物与牛血清白蛋白的结合反应。探讨了 TH-PF-Mo(VI)配合物对蛋白质内源荧光的猝灭机理, 并测定了不同温度下的结合常数, 温度为 25 °C 时, 荧光猝灭法测得该反应的结合常数为 $K=4.78 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 温度为 40 °C 时, 荧光猝灭法测得该反应的结合常数为 $K=3.72 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。根据 Förster 非辐射能量转移理论, 确定了给体-受体之间的作用距离和能量转移效率($E=0.314$), 并根据热力学参数确定了 TH-PF-Mo(VI)配合物与牛血清白蛋白之间的作用力类型, 以静电引力为主。

主题词 荧光猝灭; 蛋白质; 三羟基苯基荧光酮; 配合物探针; 作用机理

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)10-1899-04

引言

荧光光谱法是研究蛋白质分子构象的一种常用而有效的方法, 该法在染料和药物等小分子与蛋白质的相互作用研究中应用比较广泛^[1,2]。但有关染料与金属离子的配合物与蛋白质相互作用的研究报道相对较少。本文采用荧光光谱法首次研究了三羟基苯基荧光酮(TH-PF)-钼(VI)配合物与牛血清白蛋白的结合反应。讨论了 TH-PF-Mo(VI)配合物对蛋白质内源荧光的猝灭机理, 并测定了不同温度下的结合常数。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LS-55 荧光分光光度计; UV-3101PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津); PHS-3B 型酸度计(上海雷磁仪器厂); SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器(江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂)。

钼标准溶液: $0.1000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 牛血清白蛋白(BSA): $100.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 放入冰箱 4 °C 保存; 三羟基苯基荧光酮($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 准确称取 0.0037 g 三羟基苯基荧光酮于 50 mL 烧杯中, 用无水乙醇溶解。转移至 100 mL 容

量瓶中, 用无水乙醇定容, 摇匀待用; 辛基苯基聚氧乙烯醚(OP)微乳液: 按照微乳液中各组分的质量比, OP: 正丁醇: 正庚烷: 水 = 5: 3.3: 0.8: 90.9 的比例, 将各组分混合均匀后, 即得所需的微乳液。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中依次加入 2.00 mL pH 7.42 Tris-HCl 的缓冲溶液, 1.00 mL 蛋白质溶液($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)以及不同体积的 TH-PF-Mo(VI)配合物溶液($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 然后用二次水稀释定容, 摇匀。用 LS-55 荧光光度计在 300~500 nm 范围内扫描: (1)测定 TH-PF-Mo(VI)配合物对 BSA 的猝灭荧光光谱图; (2)固定激发波长, 测定 BSA 的荧光光谱和与其摩尔比 1:1 的 TH-PF-Mo(VI)配合物的吸收光谱, 其重叠部分绘制成图。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质的荧光光谱

蛋白质中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在使其有内源荧光。但是, 由于这些氨基酸的结构不同, 通常荧光强度比为 100: 9: 0.5。因此, 大多数情况下可以认为蛋白质所显示的荧光主要来自于色氨酸残基的贡献。当蛋白质等荧光体与其它物质相互作用而导致荧光体荧光强度降低的现象称为

收稿日期: 2005-12-10, 修订日期: 2006-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(20577016), 山东省自然科学基金(Y2004B11)和山东省教育厅科技计划(03C05)资助项目

作者简介: 黄建华, 1954年生, 河南科技学院化工系教授

荧光猝灭作用,能猝灭荧光物质荧光强度的物质称为荧光猝灭剂。一些金属离子及其配合物、有机小分子化合物或者药物等都是荧光猝灭剂。固定 BSA 的浓度,不断增加 TH-PF-Mo(VI)配合物的浓度时,BSA 的内源荧光强度均呈现有规律的降低,如图 1 所示。同样可作出 40 °C 时蛋白质的荧光光谱图。

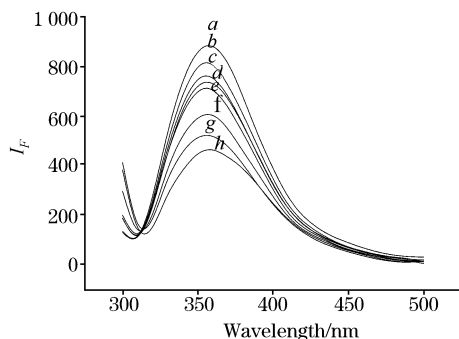


Fig. 1 Effect of TH-PF-Mo(VI) complex on the fluorescence emission spectra of BSA

$c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{TH-PF-Mo(VI)}} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the volume (TH-PF-Mo(VI)) entered from a to h in turn is 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 mL; Excitation slit=10.0 nm, emission slit=9.0 nm, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

实验发现,40 °C 时 BSA 的最大荧光发射峰峰位与 25 °C 时的峰位相比基本不变,说明蛋白质的构型不随温度的变化而变化。但是 40 °C 时 BSA 的最大荧光发射峰峰值比 25 °C 时小,这可能是因为随溶液温度的升高,介质的粘度减小,导致荧光分子与溶剂分子的碰撞机会增大,非辐射过程速率增大,从而使荧光量子产率降低。随着 TH-PF-Mo(VI)配合物的加入,BSA 的最大荧光发射峰峰值呈现有规律的降低,这说明 TH-PF-Mo(VI)配合物与 BSA 之间形成了复合物。

2.2 猝灭机理和结合常数的测定

荧光猝灭作用可分为动态猝灭和静态作用两类。动态猝灭过程是猝灭剂分子与荧光物质的激发态分子之间有能量转移或电子转移,生成瞬时的激发态复合物,从而引起荧光猝灭。静态猝灭过程是猝灭剂分子与荧光物质基态分子发生反应而产生基态配合物,这种通常不发光的基态配合物与未配合的荧光物质的基态分子竞争吸收激发光,从而降低了荧光物质的荧光强度。对于动态猝灭作用,温度升高将有利于荧光体和荧光猝灭剂分子的有效碰撞,并可以促进电子的转移过程,使动态猝灭常数 K_{SV} 随温度的升高而增大;若是静态猝灭,温度升高,产物的稳定性降低,静态猝灭结合常数 K_{LB} 减小。

为证明其猝灭过程,将此过程按动态过程处理,其荧光猝灭方程为

$$I_{\text{F}_0} / I_{\text{F}} = 1 + K_{\text{SV}} c_{\text{Q}} = 1 + K_{\text{q}} \tau_0 c_{\text{Q}}$$

其中, I_{F_0} 为未加猝灭剂时荧光物质的荧光强度, I_{F} 为猝灭剂浓度为 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 为没有猝灭剂时荧光分子的平均寿命, K_{SV} 是

Stern-Volmer 猝灭常数,是双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率。以 $(I_{\text{F}_0} / I_{\text{F}}) - 1$ 对 c_{Q} 作图,作出 TH-PF-Mo(VI)配合物对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图,如图 2 所示。

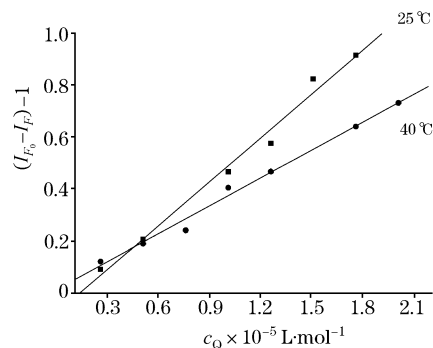


Fig. 2 Stern-Volmer quenching plot of BSA with increasing concentration of TH-PF-Mo(VI) complex

据文献[3]报道生物大分子的荧光寿命大约为 10^{-8} s ,故可由猝灭曲线的斜率求得猝灭速率常数,结果见表 1。在动态猝灭过程中,一般情况下各类猝灭剂对生物分子的最大扩散碰撞猝灭速率常数 K_{q} 不大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [4]。从表 1 可以看出, K_{SV} 随温度的升高而减小,且 TH-PF-Mo(VI)配合物对 BSA 荧光猝灭过程速率常数远远大于扩散控制的 K_{q} ,所以证明以上猝灭不是由于动态碰撞而引起的,而是形成了复合物而引起的静态猝灭。

杨曼曼[5]等提出了求取有机小分子与蛋白质等生物大分子相互作用的静态猝灭结合常数的方法,得出了荧光强度、猝灭剂浓度与静态猝灭结合常数 K_{LB} 之间的 Lineweaver-Burk 双倒数函数关系 $(I_{\text{F}_0} - I_{\text{F}})^{-1} = I_{\text{F}_0}^{-1} + K_{\text{LB}} I_{\text{F}_0}^{-1} c_{\text{Q}}^{-1}$,其中, K_{LB} 的单位是 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。以 $(I_{\text{F}_0} - I_{\text{F}})^{-1}$ 对 c_{Q}^{-1} 作图,作出不同温度下 TH-PF-Mo(VI)配合物对 BSA 荧光猝灭的双倒数图,见图 3。

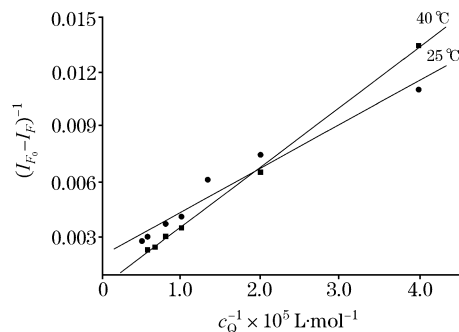


Fig. 3 Double-reciprocal curves of fluorescence intensity with concentration of TH-PF-Mo(VI) complex

由直线斜率和 I_{F_0} 值,分别求得不同温度下 TH-PF-Mo(VI)配合物与 BSA 的结合常数,计算结果见表 1。同样求得 TH-PF-Mo(VI)配合物与 BSA 的结合常数。

从表 1 可以看出,温度对 TH-PF-Mo(VI)配合物和牛血清白蛋白的结合常数影响较小,说明 TH-PF-Mo(VI)和 BSA 有较强的结合力。

Table 1 Binding parameters of BSA with TH-PF-Mo(VI) at different temperature

蛋白质 (Protein)	温度 /°C	$K_{SV}/$ ($L \cdot mol^{-1}$)	$K_q/$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)	$K_{LB}/$ ($L \cdot mol^{-1}$)
BSA	25	5.61×10^4	5.61×10^{12}	4.78×10^4
BSA	40	3.58×10^4	3.58×10^{12}	3.72×10^4

2.3 TH-PF-Mo(VI)配合物与蛋白质作用距离的估测

根据 Förster 能量转移^[6]理论,当两种化合物发生非辐射能量转移时必须满足以下 3 个条件:(1)供能体发荧光;(2)供能体的荧光发射光谱与受能体的吸收光谱有足够重叠;(3)供能体与受能体足够接近,最大距离不超过 7 nm。测出 BSA 的荧光光谱与 TH-PF-Mo(VI)配合物的吸收光谱,发现

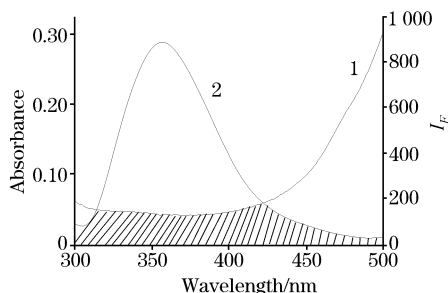


Fig. 4 Overlap spectra of TH-PF-Mo(VI) complex spectra (1) and BSA fluorescent spectra (2)

$$c_{TH-PF} = c_{Mo(VI)} = c_{BSA} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot L^{-1}, t = 25 \text{ } ^\circ C$$

Table 2 Energy transfer efficiency E , R_0 , r and J values between TH-PF-Mo(VI) and proteins at different temperature

蛋白质	温度/°C	能量转移效率	重叠积分 $J/(\text{cm}^3 \cdot L \cdot \text{mol}^{-1})$	临界距离 R_0/nm	给体-受体距离 r/nm
BSA	25	0.314	1.23×10^{-14}	2.53	2.89
BSA	40	0.289	1.22×10^{-14}	2.54	2.94

由表 2 可知,不同温度下 BSA 与 TH-PF-Mo(VI)配合物探针的 r 是比较接近的。能量转移效率越高,能量给体与受体间距离越小。TH-PF-Mo(VI)与白蛋白结合后,与色氨酸残基之间的距离 $r < 7 \text{ nm}$,符合非辐射能量转移的条件,更进一步说明 TH-PF-Mo(VI)与牛血清白蛋白的猝灭机理为静态猝灭。

2.4 猝灭过程中热力学函数的变化

荧光猝灭剂与生物大分子的作用属于分子间的弱相互作用,包括氢键、范德华力和静电引力、疏水作用力等。不同猝灭剂与蛋白质结合的作用力类型是不同的。当温度变化不太大时,结合反应的焓变 ΔH 可看成是一个常量,根据以下热力学公式可求得 TH-PF-Mo(VI)与 BSA 结合的 ΔG , ΔH 和 ΔS ,结果见表 3。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

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

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3)$$

Ross^[8]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。即根据反应前后热力学焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对

两光谱有较大的重叠,见图 4。同样也可作出 40 °C 时配合物的吸收光谱和 BSA 的荧光光谱的重叠光谱图。

根据理论,荧光体与猝灭体之间的能量转移效率(E)和两者之间的距离(r)的关系为

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

其中 R_0 为能量转移效率 50% 时对应的距离 $R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \varphi J$,式中 K^2 为取向因子,可取受能体和供能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, φ 为给体的光量子产率,通常取蛋白质色氨酸量子产率为 0.118^[7], J 为给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱的重叠积分,可表示为

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

$I_{F(\lambda)}$ 为荧光给体(蛋白质)在波长 λ 时的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为受体(探针)在波长 λ 处的摩尔吸光系数, $\Delta \lambda$ 为计算时分割的波长跨度。将波长在 300~500 nm 范围内的重叠光谱划分为极小的面积求和得 $J(\text{cm}^3 \cdot L \cdot \text{mol}^{-1})$ 。

而能量转移效率 E 又可以由下式测定

$$E = 1 - I_F/I_{F_0}$$

其 I_F 中 I_{F_0} 和分别为能量接受体存在和不存在时能量给予体的荧光发射强度。显然,只要得到 E , K^2 和 N ,并通过实测光谱求出积分面积 J ,就可算出 R_0 和 r ,结果如表 2 所示。

大小,可以判断荧光猝灭剂与蛋白质之间的主要作用力类型。 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 为疏水作用力; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 为氢键和范德华力; $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 为静电引力。由表 3 可知,TH-PF-Mo(VI)配合物与 BSA 之间的作用力主要是静电引力。但应当指出,血清白蛋白结构很复杂,它和猝灭剂之间往往同时存在几种作用力。因此,对于一个实际体系,其宏观表现可能是这几种作用力同时作用和有关环境综合调控的结果。

Table 3 Thermodynamic parameters of BSA with TH-PF-Mo(VI)

蛋白质	温度 /°C	ΔG /($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔH /($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS /($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
BSA	25	-26.70	-13.07	45.74
BSA	40	-27.38	-13.07	45.72

3 结 论

实验结果表明,TH-PF-Mo(VI)配合物对牛血清白蛋白

的荧光产生猝灭,且猝灭过程是由于形成化合物而引起的静态猝灭。根据 Förster 能量转移理论对作用距离进行了计算,进一步说明了猝灭类型为静态猝灭。通过配合物与牛血清白

蛋白作用的热力学参数的计算,发现两者主要以静电引力为主,这为研究和了解生物大分子与小分子作用的化学本质提供了依据。

参 考 文 献

- [1] LI Gai-xian, LI Jian-qing, WEI Yu-xia, et al(李改仙, 李建晴, 魏玉霞, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(8): 1277.
- [2] HE Hua, YE Hai-ying, DAI Li, et al(何 华, 叶海英, 戴 丽, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(3): 480.
- [3] 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.
- [4] Ware W R. J. Phys. Chem., 1962, 66(3): 455.
- [5] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨 频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [6] Baptista M S, Indig G L. J. Phys. Chem., B, 1998, 102(23): 4678.
- [7] Yang P, Yang M M, Yang B S. Chinese J. Chem., 1996, 14(2): 109.
- [8] Ross D P, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096.

Study on the Mechanism of Interaction between TH-PF-Mo(VI) Complex and Bovine Serum Albumin by Fluorimetric Method

HUANG Jian-hua¹, MA Hong-min², SUN Shu-ting², CHEN Xin², DONG Hai-xia³, WEI Qin²

1. Department of Chemical Engineering, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Ji'nan University, Ji'nan 250022, China

3. Shandong Jien Pharmaceutical Research Co., Ltd, Ji'nan 250100, China

Abstract The mechanism of interaction between bovine serum albumin (BSA) and trihydroxyphenylfluorone(TH-PF)-Mo(VI) complex in neutral solution was studied by fluorimetric method. The mechanism of fluorescence quenching of BSA caused by (TH-PF)-Mo(VI) complex probe was investigated and the binding constants under different temperature were measured. The binding constants of the reaction at 25 °C and 40 °C were calculated by fluorimetric method to be $4.78 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $3.72 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. According to the theory of Förster non-radiation energy transfer, the binding distance and transfer efficiency at 25 °C were calculated to be 2.89 nm and 0.314, respectively. Furthermore, the thermodynamic parameters were measured and the results indicated that electrostatic force played a major role in the interaction between TH-PF-Mo(VI) complex and BSA.

Keywords Fluorescence quenching; Protein; Trihydroxyphenylfluorone(TH-PF)-Mo(VI); Complex probe; Interaction mechanism

(Received Dec. 10, 2005; accepted Jun. 20, 2006)